

## **B. Génotypage et PNAGRT (Programme National d'Amélioration Génétique pour la Résistance à la Tremblante).**

### 1. Principe de la résistance génétique.

#### a. Historique.

L'existence d'un contrôle génétique de la sensibilité à la tremblante est bien établie. Les premiers travaux à ce sujet datent des années soixante, en Angleterre (Dickinson *et al.*, 1968). Ces expériences ont permis de mettre en évidence l'action d'un gène à effet majeur : le gène « Sip » pour « *Scrapie incubation period* », qui déterminait la période d'incubation de la maladie. Ce gène est autosomal et comporte deux allèles : sA pour *short incubation* et pA pour *prolonged incubation*.

Plus tard, il a été prouvé que le gène Sip et le gène PrP, qui code pour la protéine Prion étaient bien les mêmes (Hunter *et al.*, 1989 ; Goldmann *et al.*, 1989).

Ainsi, le polymorphisme du gène PrP-p est lié à la variabilité de la résistance à la tremblante.

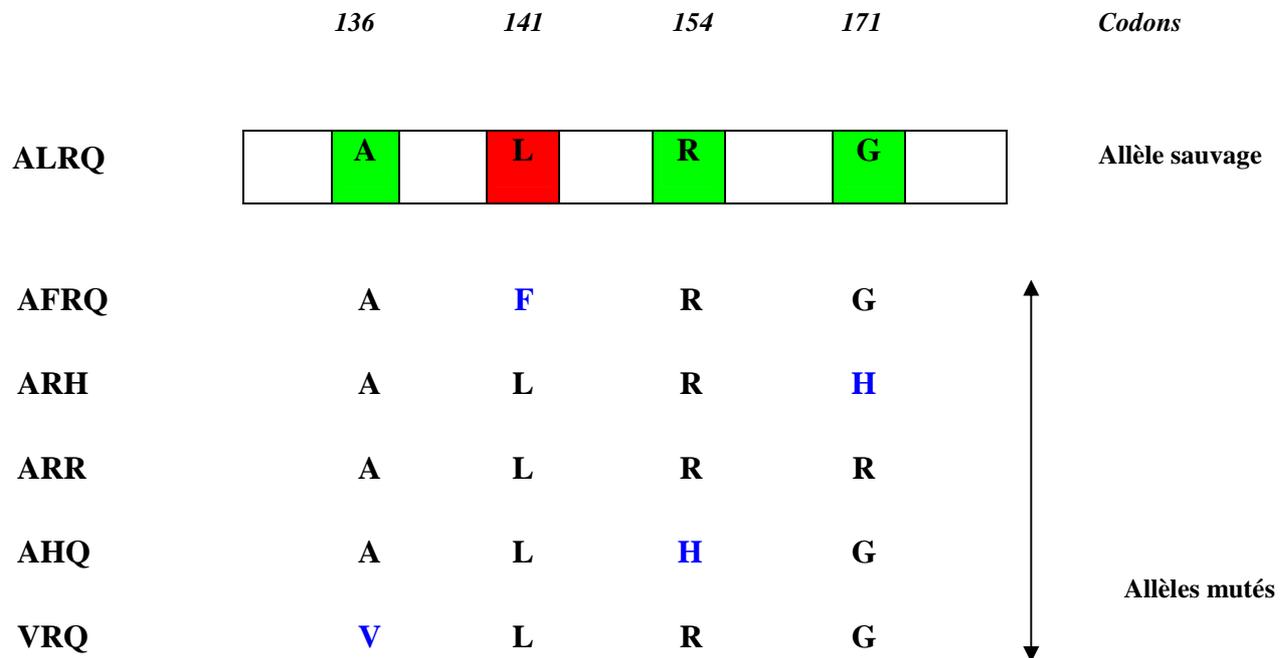
#### b. Polymorphisme du gène PrP-p.

Le polymorphisme, après avoir été observé dans des régions non codantes, affectant la longueur des fragments de restriction (RFLP), a été identifié aussi dans la région codante du gène.

Chez les ovins, plusieurs allèles du gène PrP sont connus : on en dénombre aujourd'hui quatorze (Elsen *et al.*, 2002 ; Palhière *et al.*, 2002). Toutefois, seulement quatre de ces polymorphismes ont une influence sur la résistance à la tremblante : il s'agit pour la tremblante classique des différences aux codons 136, 154 et 171, auxquels on ajoute le codon 141 pour la tremblante atypique (Schelcher, 2006). Les allèles dérivent tous du même allèle ancestral nommé ARQ pour alanine au codon 136, arginine au 154 et glutamine au 171. Les différents allèles observés selon les polymorphismes aux codons 136, 141, 154 et 171 sont représentés sur la figure 20.

Parmi ces allèles dérivant par mutation de l'allèle ARQ, et si l'on s'en tient aux trois codons influençant la tremblante classique, sept ont été détectés (Palhière *et al.*, 2002) : TRQ, ARQ, VRQ, AHQ, ARH, ARR, ARK, (TRQ et ARK restants très rares et peu documentés).

**Figure 20 : Polymorphisme du gène PrP chez les ovins, lié à des différences de sensibilité à la tremblante. (d'après Elsen *et al.*, 1997 ; Schelcher, 2006).**



A : alanine, R : arginine, H : histidine, G : glutamine, V : valine, L : leucine, F : phénylalanine.

2. Influence du polymorphisme sur le tableau clinique et lésionnel de la tremblante naturelle (d'après Elsen *et al.*, 1997).

Selon le génotype que possède l'animal aux codons 136, 154 et 171 du gène PrP, il est plus ou moins résistant à la tremblante classique. L'homozygotie ARR/ARR donne une forte résistance : aucun animal ARR/ARR n'a été trouvé atteint de tremblante classique dans les conditions naturelles. L'homozygotie VRQ/VRQ confère une grande sensibilité. Entre les deux, on a des résistances et sensibilités intermédiaires selon les génotypes : elles sont illustrées dans la figure 21. Les allèles ARR sont toujours associés à une résistance aux souches de tremblante classique, les allèles AHQ en général, alors que les allèles VRQ et ARQ sont respectivement toujours et en général associés à une sensibilité.

De plus, les animaux ARR/ARR ne seraient pas porteurs sains (Elsen *et al.*, 2002), et seraient également résistants à l'ESB (Palhière *et al.*, 2002).

Résistance et sensibilité à la tremblante se traduisent expérimentalement par des différences de temps d'incubation et de temps de survie (Hunter, 2007).

Vu la variété des races et des milieux étudiés, il semblerait que la majorité des souches tremblante classique soient concernées (Elsen *et al.*, 1997, Palhière *et al.*, 2002).

**Figure 21 : Allèles, génotype et résistance à la tremblante classique (d'après Brochard, 2004).**

Allèles	ARR				AHQ			ARQ	VRQ	
Génotypes complets	ARR	ARR	ARR	ARR	AHQ	AHQ	AHQ	ARQ	ARQ	VRQ
	ARR	AHQ	ARQ	VRQ	AHQ	ARQ	VRQ	ARQ	VRQ	VRQ
Génotypes simplifiés	R/R	R/S			S/S					
Comportement par rapport à la tremblante.	<i>Résistant</i>				<i>Intermédiaire</i>			<i>Sensible</i>		

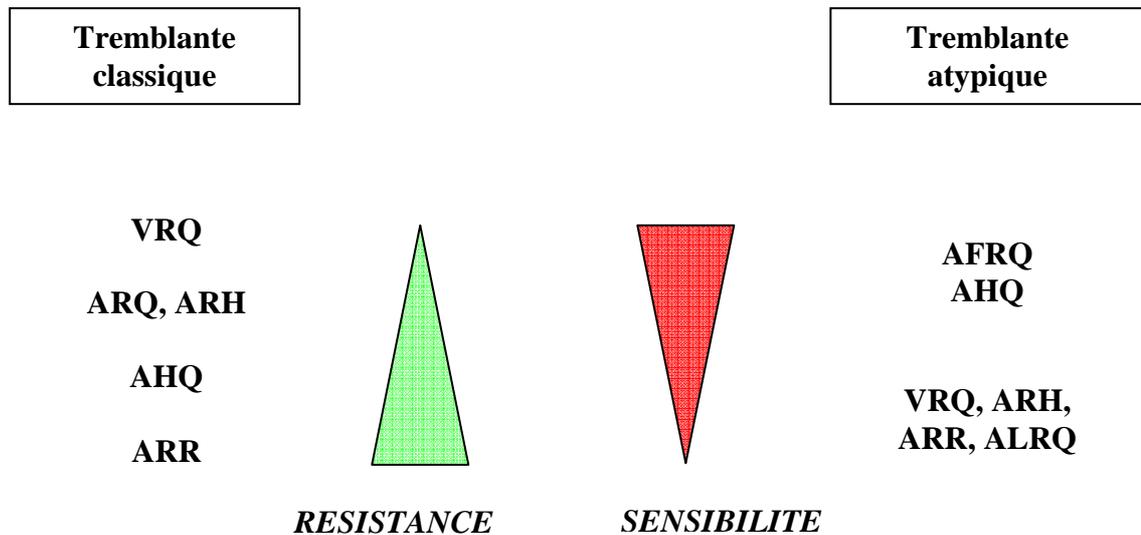
On peut cependant se poser la question de l'universalité de cette résistance.

### 3. Problème de la tremblante atypique.

La tremblante atypique, de sensibilité génétique différente (voir figure 22), pose aujourd'hui un nouveau problème dans lequel nous n'entrerons pas en détail ici. Mais elle montre déjà que cette résistance génétique n'est pas universelle (Lühken *et al.*, 2007, Schelcher, 2006 et Hunter, 2007 pour une revue).

Cependant, la tremblante atypique ne remet pas en cause la sélection sur ARR, elle permet au contraire de diminuer le risque (Moreno et Calavas, 2006).

**Figure 22 : Sensibilité génétique à la tremblante classique et atypique (d'après Palhière et Moreno, 2007).**



Dans la suite de ce travail, nous sous-entendons sous le terme de tremblante la seule tremblante classique.

4. Programme national d'amélioration génétique pour la résistance à la tremblante (PNAGRT).

a. Contexte.

La tremblante est une maladie connue depuis longtemps dans les troupeaux ovins français. Les conséquences économiques sont en général faibles, sauf dans quelques cas particuliers. Par exemple, la tremblante pouvait toucher jusqu'à 20% des animaux par an dans certains troupeaux de race Manech. Les aspects économiques ne justifiaient donc pas à eux seuls un programme de lutte contre la tremblante.

Par ailleurs, la tremblante ovine n'étant pas transmissible à l'homme, l'argument « zoonose » n'était pas non plus justifié pour lutter contre cette maladie.

C'est en fait le « principe de précaution » appliqué dans le contexte de la crise sanitaire due à l'encéphalopathie spongiforme bovine ou ESB qui a amené le Ministère de l'Agriculture à mettre en place le PNAGRT en octobre 2001. En effet, les autorités redoutaient que l'agent de l'ESB puisse passer chez les ovins, ce qui aurait fait courir un risque élevé de contamination des consommateurs, et aurait plongé la filière viande ovine dans une crise profonde.

b. Bases génétiques.

Les ovins génétiquement résistants à la tremblante le sont également à l'inoculation expérimentale de l'agent de l'ESB. Ces données ont donc justifié un plan d'amélioration génétique à grande échelle, pour pouvoir produire des agneaux de boucherie résistants et ainsi protéger le consommateur. (Palhière *et al.*, 2002).

Ainsi, ce programme a été mis en place sous deux réserves : l'universalité de la résistance, et l'absence de liaison génétique avec les caractères de production (lait, laine, etc.). Elle a donc débuté au niveau européen dans trois pays : Grande-Bretagne, Pays-Bas et France, bientôt suivis par d'autres. Le plan en France, agréé en 2002, a été programmé pour cinq ans, et prolongé encore pour deux ans (jusqu'en 2009). Il a été budgété à hauteur de 13,3 millions d'euros (Palhière *et al.*, 2002).

c. Objectifs.

Les objectifs du programme national tendent tous vers un même but : rendre génétiquement résistante à la tremblante la totalité du cheptel ovin français. Ils ont été inclus dans les schémas de sélection, et appliqués dans les UPRA (Unités de Promotion des Races). Ils sont les suivants (d'après Brochard, 2003 et 2004) :

- Eliminer l'allèle de sensibilité VRQ.
- Repeupler les élevages atteints par la tremblante avec des animaux résistants.
- Sélectionner l'allèle de résistance ARR.
- Diffuser des béliers homozygotes ARR pour la production d'agneaux de boucherie.

Ces objectifs sont bien sûr à mettre en œuvre avec précautions, car ils amènent un nouveau paramètre de sélection, qui ne doit pas se faire au détriment des autres poursuivis en matière de production ou de conservation. Le niveau et la variabilité génétique doivent être préservés, c'est pour cela que les stratégies de mise en œuvre du programme sont raisonnées et adaptées à la situation de chaque race. La nécessité du maintien de la variabilité et des niveaux génétiques est toujours soulignée quelle que soit la stratégie de sélection choisie.

d. Conséquences pratiques d'application pour les petites populations.

i. Problématique.

Pour toutes les races, et surtout celles à petits effectifs, la mise en œuvre d'un programme de sélection quel qu'il soit pose des problèmes particuliers. Comme nous l'avons vu en première partie, il s'agit surtout de maintenir la variabilité génétique en minimisant l'augmentation de consanguinité, et donc d'utiliser des origines les plus diverses possibles dans chaque race. L'ajout d'un critère de sélection modifie la gestion de ces petites populations, qu'il faut adapter à chaque cas.

Mais la mise en place de ce plan agit aussi en faveur de la biodiversité, dans la mesure où elle donne à ces petites races les mêmes chances qu'aux autres de se protéger contre le risque de tremblante (Brochard, 2004).

ii. Application concrète du PNAGRT dans les races à petits effectifs.

Concrètement, la marche à suivre est la suivante (d'après Brochard, 2003).

Il s'agit dans un premier temps d'identifier les mâles d'intérêt, indépendamment de leur génotype PrP. Ce sont surtout, pour les races à petits effectifs, les mâles importants du point de vue de la variabilité génétique.

Pour cela, il faut inventorier les différentes lignées ou familles : on met ainsi en évidence les mâles à préserver pour chacune. On doit garder des représentants pour chaque famille, et conserver un certain équilibre entre celles-ci.

De plus, on ne doit pas négliger les mâles importants pour le maintien des performances, ce sont ceux à haute valeur génétique, pour les races ayant un contrôle de performances et un schéma de sélection.

Une fois ces mâles répertoriés, on les génotype. Plusieurs cas de figure peuvent se présenter :

- *Le mâle est sensible (de génotype simplifié S/S).*

On ne peut pas l'éliminer car on perdrait en variabilité génétique, il faut cependant introduire la résistance dans sa descendance. Le principe à appliquer est alors celui de préservation de lignée en deux générations, il est illustré par la figure 23. Tout d'abord, on fait s'accoupler ce mâles important avec suffisamment de brebis, ce qui constitue la première génération. Ensuite, on génotype tous ses descendants mâles et parmi ceux-ci, on détecte les porteurs d'un allèle ARR. On fait alors s'accoupler ces hétérozygotes résistants ou intermédiaires avec suffisamment de femelles. Parmi les agneaux issus de ces derniers accouplements, on aura des homozygotes ARR, que l'on utilisera préférentiellement.

Ainsi, on a rendu la lignée résistante.

Pour déterminer le nombre suffisant de femelles à accoupler, on se fixe comme objectif d'obtenir au moins quatre mâles intermédiaires par mâle sensible d'intérêt.

En faisant des tris à chaque génération sur phénotype et génotype, on obtient un total de 18 brebis (avec l'hypothèse qu'elles soient toutes fécondées et à 2 de prolificité).

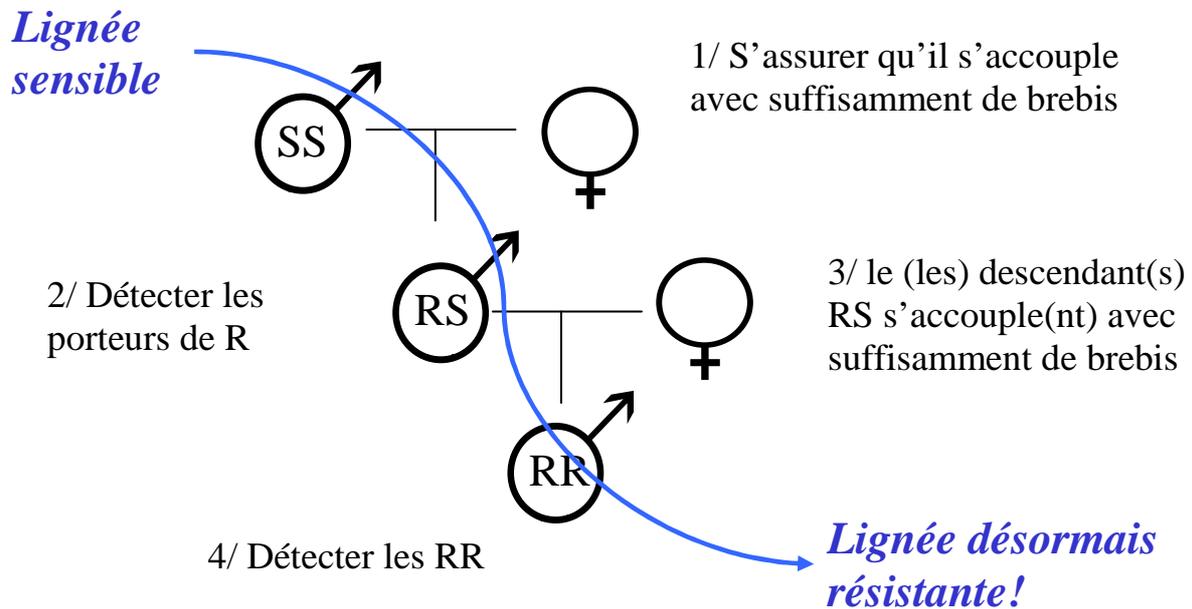
- *Le mâle est intermédiaire (de génotype simplifié R/S).*

Dans ce cas, on effectue le même principe d'introduction de résistance dans la lignée, sauf que le nombre de femelles à accoupler est deux fois plus important.

- *Le mâle est résistant (de génotype simplifié R/R).*

On doit alors l'accoupler avec un nombre suffisant de femelles pour obtenir des descendants résistants.

**Figure 23 : Introduction de la résistance dans une lignée par le principe de préservation en deux générations (d'après Brochard, 2003).**



Si le génotype des femelles est connu lui aussi, on augmente la rentabilité. Par exemple, on accouplera préférentiellement des femelles résistantes de type R/R avec des mâles sensibles S/S à préserver, afin d'obtenir directement plus d'animaux à sensibilité intermédiaire à la seconde génération. Génotyper les brebis présente donc l'avantage, de pouvoir accoupler moins de mâles résistants, mais aussi d'orienter leur réforme (les plus sensibles en priorité). Cependant, compte tenu de son coût, le génotypage des femelles ne reste pas facile à mettre en œuvre pour toutes les races.

5. Mise en place de mesures complémentaires à la sélection pour la préservation de la variabilité génétique.
  - a. Création d'outils de sauvegarde.

Pour préserver des lignées non résistantes mais d'intérêt génétique pour la race, on a dû recourir à différents outils, comme par exemple la cryoconservation ou la procréation de mâles résistants.

Ceci peut être illustré par différents exemples :

- *Cas de la race Roussin de la Hague (d'après Parot et al., 2004).*

Le Roussin de la Hague est une race à petit effectif (on recense 7 à 8000 femelles), et de forte sensibilité à la tremblante. En effet, elle possédait en 2002 la fréquence initiale de l'allèle VRQ la plus élevée de toutes les races françaises (35% des mâles génotypés en 2002), et la fréquence de l'allèle ARR la plus faible (17% des mâles génotypés en 2002). La mise en place du programme d'éradication génétique pour la résistance à la tremblante devait donc tenir compte de la gestion de la variabilité génétique. Pour cela, les reproducteurs mâles ont été inventoriés en familles, et un centre d'élevage de jeunes béliers a été ouvert. Parallèlement, la semence des béliers sensibles a été récoltée et conservée à la Cryobanque Nationale.

En appliquant le programme, la fréquence des béliers sensibles a été diminuée de moitié et celle des résistants doublée en une année de sélection. Ce progrès s'est fait sans porter atteinte à la variabilité génétique de la race, car les génotypes ont été ciblés sur les animaux importants, et des outils de sauvegarde de cette variabilité ont été créés. L'exemple du Roussin de la Hague montre que la sélection pour la résistance à la tremblante est possible même dans une race en conservation avec une situation initiale défavorable.

- *Cas de la race Landaise (d'après Gaviglio-Metral, 2004).*

Dans le cas de la race Landaise, la situation était encore plus critique. Sur les quelques centaines d'animaux de la race, près de 42% étaient de génotype sensible, et 27% portaient l'allèle d'hypersensibilité VRQ. De plus, un seul et unique bélier ARR/ARR de bonne conformation se trouvait être disponible pour la reproduction dans toute la race.

Une stratégie de sélection spécialement adaptée à la Landaise a donc été mise en place. Elle comprenait, comme dans le cas du Roussin de la Hague, la cryoconservation de semences des béliers ARR/ARR, et la création d'une « pépinière » de mâles résistants. Les femelles ont été aussi génotypées pour diffuser le progrès par les deux sexes.

Pour cela, l'unique mâle disponible a été croisé avec des femelles hétérozygotes ARR ne possédant pas l'allèle VRQ. On a obtenu ainsi une trentaine d'agneaux dont la moitié homozygotes ARR. Cependant, l'utilisation d'un seul bélier étant une grave erreur en matière de gestion de la variabilité génétique, il a été discuté de l'utilisation de trois autres béliers homozygotes ARR, mais mal conformés. On atteindrait ainsi à long terme l'objectif, mais au prix d'une réduction des performances voire même de la variabilité génétique.

Cet exemple montre combien l'application du programme de sélection pour la résistance à la tremblante peut se révéler difficile à mettre en œuvre dans les petites races à forte sensibilité.

b. Utilisation préalable de simulateurs de sélection.

La simulation est utile pour déterminer le rythme de sélection adéquat qui permettrait de ne pas trop augmenter la consanguinité.

En Allemagne par exemple, des simulations ont été faites pour pouvoir appliquer la sélection sur la résistance à la tremblante sans pour autant affecter la variabilité génétique (Drögemüller *et al.*, 2004). Ces études ont été menées pour plusieurs races rustiques à faibles effectifs, dont certaines sont en danger comme la *German alpine stone*, ou la *Gotland*, dont les effectifs génétiques s'élèvent à 19 et 56 individus respectivement.

Il en ressortait que pour obtenir 99% d'homozygotes ARR, cela prendrait de six à neuf générations selon les fréquences alléliques initiales, et qu'ainsi pour les races à petits effectifs des plans d'accouplements spécifiques devaient être mis en place pour éviter une augmentation de la consanguinité.

Le principe général du plan se basait sur une sélection lente, graduée, par paliers successifs. Dans un premier temps, utilisation de béliers hétérozygotes ARR pour accroître la fréquence de cet allèle. Puis, après trois à cinq générations, utilisation exclusive de béliers homozygotes ARR afin d'accélérer le processus. Les résultats des simulations suggèrent que plus de 99% des individus dans ces petites races peuvent à terme être résistants si la sélection est bien menée progressivement. Cependant, pour les races à très petits effectifs comme les deux citées précédemment, une augmentation de la consanguinité moyenne serait à prévoir.

Ceci pourrait être évité par l'introduction de reproducteurs d'origines différentes, provenant de pays voisins mais de races relativement proches.

De la même manière, Windig *et al.* (2006), ont étudié la sélection sur la résistance génétique à la tremblante dans la race à petit effectif *Mergellander*. Pour cette race, la sélection posait un certain nombre de problèmes : les béliers porteurs de l'allèle ARR étaient de parentés relativement proches, et l'utilisation exclusive d'homozygotes ARR augmenterait le taux de consanguinité de la population jusqu'à la valeur de 1,53%, ce qui mettrait selon les auteurs la race en situation plus que critique.

Pour minimiser l'augmentation du coefficient de consanguinité, ils ont donc calculé la contribution optimale de chaque bélier et d'un échantillon de brebis, et établi leurs plans de lutte pour chaque campagne de manière à minimiser le coefficient de parenté des agneaux nés à la campagne suivante. C'est la théorie des contributions optimales. Ils ont calculé ces valeurs sous deux scénarios : sélection forte (utilisation exclusive de béliers homozygotes ARR) et sélection modérée (utilisation permise d'hétérozygotes).

Il en résulte que la méthode des contributions optimales dans la race *Mergellander* permettrait de réduire le taux de consanguinité de 0,17% sous sélection forte, et de 0,38% sous sélection modérée.

## 6. Bilan après six années de sélection sur la résistance génétique à la tremblante des races ovines françaises.

### a. Atteinte des objectifs.

Déjà en 2003, après deux années d'application, Palhière et Brochard montraient la grande efficacité de ce programme de sélection. Le programme portait sur plus de 550 000 brebis dans les noyaux de sélection, avec l'engagement de 26 races à effectifs grands ou moyens et de 22 races à petits effectifs. L'objectif d'augmentation de la résistance des animaux était alors déjà bien avancé, puisqu'on constatait une augmentation importante de la proportion d'animaux résistants dans la jeune génération : de 66 à 89%. En ce qui concerne les races à petits effectifs qui nous intéressent, le bilan de campagne 2003 (Brochard, 2004) montrait déjà un réel dynamisme de leur part. Aucun des jeunes béliers indexés de renouvellement en 2003 ne possédait l'allèle d'hypersensibilité VRQ.

Aujourd'hui, les résultats sont satisfaisants (Orlianges *et al.*, 2007) : tous les béliers d'IA sont au moins R/S, et en 2007, tous les béliers mis en testage sont RR. La fréquence de l'allèle ARR a subi une bonne évolution, puisqu'elle est passée de 17% initialement à 60%

parmi les agneaux nés en 2007. De plus, on dispose de suffisamment de béliers résistants pour assurer le renouvellement d'élevages atteints, et la variabilité génétique a été maintenue. Pour ce dernier point, il semble intéressant d'apporter quelques précisions.

b. Conséquences de la sélection sur le niveau et la variabilité génétique.

On peut se poser la question de savoir si la sélection pour la résistance à la tremblante a eu un impact sur la variabilité et les niveaux génétiques. Cette question a fait l'objet de plusieurs études françaises et étrangères, qui mettent en avant des résultats assez contrastés, mais positifs dans leur ensemble.

- Etude sur quatre races françaises.

Après deux années de sélection, et en étudiant les index des futurs mâles reproducteurs sur l'ensemble des races françaises, Palhière et Brochard (2003) ne notaient pas d'impact significatif de l'introduction de la sélection au locus *PrP* sur la sélection pour d'autres caractères. De plus, les indicateurs de variabilité génétique basés sur les critères de probabilité d'origine des gènes montraient une bonne conservation de la diversité des origines.

Cependant, en 2004, les mêmes auteurs, avec une étude portant sur trois races (Berrichon du Cher, Causses du Lot et Mouton Charollais) montrent que la consanguinité moyenne dans ces trois races a en effet augmenté entre 1998 et 2004. Elle est passée par exemple de 2,29 à 4,07% en Berrichon du Cher. Parallèlement, le nombre d'ancêtres efficaces a diminué dans deux races sur trois. En mouton Charollais, il est même passé de 85 à 50 entre 1998 et 2004. Cette diminution montre que la variabilité génétique est à surveiller.

De plus, les mêmes auteurs notent une stagnation du niveau génétique moyen : l'effort ayant porté sur la sélection pour la résistance à la tremblante, de légères inflexions par exemple de la valeur laitière ou de l'index de croissance ont été notées. Toutefois, ces baisses du progrès génétique restent très modérées. Finalement, les auteurs concluent que si la sélection mise en place par le PNAGRT n'est pas sans incidence sur le maintien de la variabilité génétique et l'évolution du progrès génétique dans les trois races étudiées, cet impact reste modéré. Depuis 2004, des mesures de gestion des origines par l'INRA au sein des schémas de sélection ont été mises en place, ceci afin de limiter cet impact.

Les données les plus récentes (Brochard *et al.* (2006) et Palhière *et al.* (2006)), montrent finalement l'impact mineur de cette sélection sur la variabilité génétique dans quatre races : Berrichon de Cher, Causses du Lot, Manech Tête Rousse et Mouton Charollais, à travers l'analyse de 29 marqueurs microsatellites faite avant et après sélection. Ainsi, ces auteurs ont mis en évidence comme on pouvait s'y attendre une perte de variabilité très nette au gène *PrP* (-60% d'hétérozygotie) et aux marqueurs qui lui sont proches (-40% d'hétérozygotie). En revanche, cette perte d'hétérozygotie n'était que de 2% au maximum pour les autres marqueurs, ce qui est négligeable. En outre, l'étude de la probabilité d'origine des gènes n'a pas montré dans ces études d'évolution sensible, on a donc évité l'effet de goulot d'étranglement. Seule une baisse du nombre d'ancêtres expliquant 50% des gènes était à noter en Berrichon du Cher.

Parallèlement, l'étude de l'évolution annuelle moyenne des niveaux génétiques basés sur les caractères de production n'a pas montré d'influence majeure de cette sélection. La conclusion de cette étude se révèle donc positive, car l'application raisonnée du PNAGRT a permis un maintien des performances tout en évitant une perte de variabilité génétique dans les quatre races étudiées.

Palhière *et al.* (2006) expliquent ce maintien de variabilité par le temps court de recul pour étudier l'impact de la sélection, qui pourrait être un biais dans cette étude. De plus, la rapidité d'atteinte des objectifs a été réalisée en étant moins intransigeants sur les critères de sélection économique, comme en Causses du Lot par exemple : on a utilisé des animaux de phénotype ou d'intérêt génétique moindre, ce qui a eu le mérite d'introduire des animaux de nouvelles origines, augmentant ainsi le nombre d'ancêtres efficaces. Cependant, Brochard *et al.* (2006) affirment qu'on ne peut pas extrapoler ces résultats à d'autres races, et qu'il serait donc utile de pouvoir étendre cette étude.

- Cas des populations à faibles effectifs.

Dans ce cas, c'est davantage le maintien de la variabilité génétique qui nous intéresse. En Espagne, Alvarez *et al.* (2007) rapportent un cas de perte de variabilité génétique suite à la sélection sur la résistance génétique à la tremblante dans la race *Xalda*. L'analyse du polymorphisme moléculaire de 14 microsatellites sur 304 reproducteurs a mis en évidence une perte moyenne d'hétérozygotie de près de 2%. Les auteurs en concluent que l'application

d'une sélection trop stricte dans le choix des reproducteurs n'est pas en accord avec les programmes de conservation.

L'application du PNAGRT ayant été prolongée jusqu'à 2009, il faudra certainement attendre encore quelques années pour avoir des résultats plus nombreux concernant d'autres races à petits effectifs.

