

Effect of Butyrophilin polymorphism on milk quality

Effet du polymorphisme du gène codant la butyrophiline sur la qualité du lait

M. MAKHZOUMI-KADRI¹, B. JEMMALI², N. BOURIGUA³

¹ Higher School of Sciences and Techniques of Health of Tunis

² Laboratory of Improvement and Integrated Development of Animal Productivity and Food Resources, Higher School of Agriculture of Mateur, University of Carthage, Tunisia

³ Marine Biology Unit. Faculty of Sciences of Tunis 2092 University campus. Tunisia

Abstract – Genetic polymorphism of the gene coding for butyrophilin was studied in 88 Holstein cows. This study aimed to identify the different genotypes and their effect on milk quality. Genomic DNA was extracted according to saline method and the coding sequences were amplified using specific primers. 501 bp PCR products were digested with HaeIII. Results showed that the average fat content (MG), protein (MP), lactose, total dry extract (TSE) and the somatic cells account were respectively about 3.41 (0.67)%, 3.16 (0.34)%, 4.7 (1.2)%, 12.3 (3.2)%, 124882 (189625) cells / ml. digested products revealed three AA genotypes; BB and AB represented respectively by 6.8%; 83.2% and 10%. Allelic frequencies were 12% and 88% respectively for alleles A and B. The analysis of variance by the SAS software showed an effect of the genotype on studied characters. The presence of A allele affect significantly the milk fat content ($P < 0.05$). The same effect was observed for the total dry extract. Somatic cells are significantly affected by the genotype ($p < 0.05$) and the AA homozygous have the highest content. These results can be used as a way to improve the of milk quality.

Keywords: Butyrophilin, polymorphism, milk quality, bovine

Résumé - L'étude du polymorphisme génétique du gène codant la butyrophiline a été réalisée chez 88 vache Holstein. Dans l'objectif de l'identification des différents génotypes au niveau de ce locus ainsi que la détermination de l'existence d'une association avec la qualité du lait. L'ADN génomique a été extrait selon la méthode saline et les séquences codantes ont été amplifiées en utilisant des amorces spécifiques. Les produits PCR de taille 501 pb ont été digérés par l'endonucléase HaeIII. Les résultats ont montré que la teneur moyenne en matière grasse (MG) été de 3.41 (0.67)%, celle de matière protéique (MP) été de l'ordre de 3.16 (0.34)%. La teneur en lactose été de l'ordre de 4.7 (1.2) %, l'extrait sec total (EST) été de 12.3 (3.2) %. Le nombre de cellules somatiques égales à une moyenne de 124882 (189625) cellules/ml. L'analyse moléculaire a révélé trois génotypes AA ; BB et AB ont été représentés respectivement par 6.8 % ; 83.2 % et 10 %. Soit des fréquences alléliques de 12 % et 88 % respectivement pour les allèles A et B. L'analyse de variance par le logiciel SAS a montré un effet signification du génotype sur les caractères en question. La présence de l'allèle A affecte significativement le teneur du lait en matière grasse ($P < 0.05$). Le même effet a été observé pour l'extrait sec total. Les cellules somatiques sont affectées significativement par le génotype ($p < 0.05$). On a pu déduire que les homozygotes AA ont la teneur la plus élevée. Les résultats de cette étude peuvent être utilisés comme un moyen pour l'amélioration de la qualité du lait.

Mots clés : Butyrophiline, polymorphisme, qualité du lait, bovin

1. Introduction

Le secteur laitier en Tunisie est l'un des secteurs stratégiques de l'agriculture et de l'économie nationale. En fait, suite à la demande croissante des produits laitiers, depuis les années 90, l'état a encouragé l'investissement dans l'élevage de vaches laitières. Et par conséquent, la Tunisie a atteint l'autosuffisance en lait depuis 1999.

Cette progression enregistrée au niveau du secteur laitier est due à l'augmentation du cheptel laitier et l'importation de races bovines assurant un rendement de production élevé. Malgré cette évolution croissante remarquable de la production, l'aspect qualité est resté défaillant. Ce qui appelle à l'amélioration de ce secteur pour atteindre de meilleurs résultats.

Il y a un lien fort entre génétique et qualité du lait : en effet, les taux protéiques (TP) et de matières grasses (TB), qui garantissent la qualité du lait pour le consommateur et les propriétés du lait à être transformé, sont directement liés aux index d'évaluation génétique des animaux. Ainsi, par la sélection, on peut choisir d'orienter ces taux au sein d'un troupeau ou d'une race. Cette sélection est d'autant plus importante que la composition du lait varie selon les races.

Notre travail a comme objectif l'identification des différents génotypes au niveau du locus codant la butyrophiline ainsi que la détermination de l'existence d'une association potentielle avec la qualité du lait.

2. Matériel et méthodes

Des prises de sang depuis la veine jugulaire de 88 vaches de races Prim'Holstein ont été effectuées lors de cette étude. Ces individus appartiennent à 4 fermes différentes. La quantité de sang prise est de 5ml, mises dans des tubes sous vide contenant K3EDTA puis conservé à -20°C pour l'extraction d'ADN génomique.

2.1. Extraction et estimation de la quantité et de la qualité de l'ADN génomique

Le protocole suivi lors de l'extraction de l'ADN génomique est celui de l'extraction saline établi par Sambrook et al. (1989).

L'estimation de la quantité d'ADN a été faite à l'aide de la mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 260nm grâce à un spectrophotomètre. Quant à la vérification de la qualité d'ADN, elle a été réalisée par une électrophorèse sur gel d'agarose 0.8%.

2.2. Mise au point de technique PCR-RFLP

Les amorces lyophilisées (invitrogène) F :5'- TGGTAGGTCAGGAAGCCATC-3' et R :5'-GTATTCAGCCATCTCCTCGC-3' sont dissoutes dans du tampon de dilution pour avoir une concentration finale de 100pmol/μl.

Le mélange réactionnel se compose de deux amorces, dNTP, MgCl₂, H₂O, Taq polymérase et du tampon. La PCR est réalisée avec un volume final de 25μl.

Après quelques essais une température d'hybridation adéquate a été trouvée. La dénaturation initiale a été réalisée à 95°C durant 5 min. 39 cycles d'amplification chaque cycle comprend une dénaturation à 95°C pendant 30s, ensuite une hybridation des amorces à 62°C pendant 30s, une élongation à 72°C durant 45s, et enfin une extension finale à 72°C pendant 10min.

La spécificité ainsi que le rendement d'une réaction d'amplification sont vérifiés par une migration sur un gel d'agarose 2% avec une tension de 120 volts et une durée de 60min.

Après amplification, 8μl du produit PCR sont digérés par l'enzyme dans un volume réactionnel de 25 μl. Cette étape est très importante, elle se fait par une électrophorèse sur un gel d'agarose 2%. La tension de courant est de 70 volts durant 40min. 12μl du produit de digestion ont été mis dans chaque puits. Chaque série comprend généralement un produit PCR non digéré mis dans le premier puits. Quant au dernier puits il contient le marqueur de taille afin de connaître la taille des produits digérés.

2.3. Analyse statistique

Afin de déterminer l'effet du génotype on a procédé à une analyse de variance selon le modèle statistique suivant :

$$Y_i = \mu + X_j + E_{ijk}$$

Où Y_i : MG ; MP ; ESD ; Lactose ou Taux de cellule somatique

X_j : le génotype de l'individu : AA ; BB ou AB

E_{ijk} : erreur de l'échantillon

3. Résultats et discussion

3.1. Qualité du lait

Pour notre étude les analyses ont été faites essentiellement pour la teneur en matière grasse (MG), la teneur en matière protéique (MP), le lactose et l'extrait sec total par faute d'outil d'analyse.

Le troupeau laitier a présenté une production laitière moyenne de l'ordre de 21.32 (6.7) Kg/ vache présente/jour. La teneur moyenne en matière grasse (MG) été de 3.41 (0.67)%, celle de matière protéique (MP) était de l'ordre de 3.16 (0.34)%.

La teneur en lactose était de l'ordre de 4.7 (1.2) %, l'extrait sec total (EST) était de 12.3 (3.2) %.

Les teneurs en matière grasse ou protéique représentent l'équilibre énergétique et azoté de la ration. Nos résultats sont aussi similaires de ceux trouvés par Bouraoui et al. (2014). Ce dernier a trouvé 3.32 % pour la MP et 3.56% pour la MG et 26.17 kg/j pour la PL. Le taux de cellules somatiques a été déterminé pour les différents échantillons du lait. Le nombre de cellules somatiques égales à une moyenne de 124882 (189625) cellules/ml de lait produit.

Le score des cellules somatiques est de 124882 cellules/ml, qui est dans les normes tunisiennes. Une vache saine a un nombre de cellules < 125000 / ml. Si le nombre de cellules dépasse 200000/ml, la vache n'est plus en bonne santé. Au contraire, Bouraoui et al. (2013), ont trouvé 557000 ± 1351 cellules /ml et ont constaté que les facteurs qui affectent significativement le score des cellules somatiques (SCS) sont l'âge au vêlage, le stade de lactation, le mois de contrôle et les interactions mois de contrôle*année de vêlage, mois de contrôle*saison de vêlage.

3.2. Etude du polymorphisme génétique du gène codant la butyrophiline

Les échantillons d'ADN génomique obtenues à partir du sang, des vaches, collectés dans des tubes EDTA est de bonne qualité. L'extraction par la méthode saline nous a permis des quantités considérables d'ADN.

Il existe des gènes spécifiant des protéines quantitativement mineures du lait, mais ayant une importance de point de vue qualité du lait produit. L'ensemble de ces gènes exprimés dans la glande mammaire et estimer leur niveau d'expression est spécifiquement induite par un événement.

La butyrophiline (BTN1A1) est spécifiquement exprimée dans les tissus de la glande mammaire en lactation. L'amplification des régions codante pour cette protéine par des amorces spécifique a généré des bandes de taille 501 pb.

La digestion des produits PCR permet la détermination du génotype chaque individu analysé. Les résultats obtenus nous ont permis la réalisation de la deuxième partie du travail qui consiste à une digestion enzymatique des produits d'amplification. Dans notre cas, la digestion a été faite par l'enzyme de restriction *HeaIII*. Cette endonucléase permet l'identification de la présence ou l'absence des sites de restrictions. L'attribution du génotype pour chaque individu analysé a été basée sur la présence ou non de ces sites de restriction.

Dans notre étude la digestion des produits PCR de taille 501 pb produit de trois types de profils : le premier pour le génotype AA ou on a distingué des bande de tailles 316 et 162 pb. Le deuxième pour le génotype BB ou on a distingué des bandes de taille 283 et 162 pb. Le troisième pour le génotype AB ou les bande ont les tailles de 316, 283 et 162 pb. Les fragments de petite taille peuvent ne pas être révélés à cause de la limite de l'utilisation du gel d'agarose. Donc si les bandes de taille 23 pb ou 56 pb ne sont pas visible c'est a cause du temps de migration émis qui beaucoup moins important que celui des fragments de grande taille.

En tout cas pour notre étude l'absence des bandes, de taille 501 pb, indique la présence d'au moins un site de restriction. Par contre la présence de la bande de taille 316 pb indique la présence de l'allèle A. alors que la présence des bandes de taille 283 pb indique la présence de l'allèle B. si on a les deux bandes de taille 316 pb et 283 pb ça veut dire que l'individu est hétérozygote A/B.

Suite à la digestion des produits d'amplification on a noté des fréquences génotype inégales pour les trois génotypes. Les individus AA ; BB et AB ont été représentés respectivement par 6.8 % ; 83.2 % et 10 %. Soit des fréquences alléliques de 12 % et 88 % respectivement pour les allèles A et B.

3.3. Association génotype qualité du lait

La butyrophiline est essentielle pour le bon déroulement du processus de sécrétion de la matière grasse dans le lait. Le gène codant pour la Butyrophiline comprend 8 exons et 7 introns (Seyfert et al. 1998).

Suite à une infection mammaire, les bactéries peuvent sécréter des enzymes (lipases, les phospholipases), et des protéases et leurs effets peuvent affecter les propriétés et la composition de la matière grasse et peuvent conduire à des défauts de saveur. La Butyrophiline est un membre de la famille des Immunoglobulines, cette protéine possède diverses fonctions telles que l'inhibition de la croissance des cellules cancérigènes, et d'autres propriétés bactéricides.

Suite à la détermination de la qualité chimique des échantillons du lait ainsi que l'identification des génotypes des individus, nous avons procédé à une analyse statistique pour dévoiler l'association génotypes caractères étudiés.

L'analyse de variance par le logiciel SAS a montré un effet signification du génotype sur les caractères en question.

La présence de l'allèle A affecte significativement le teneur du lait en matière grasse ($P < 0.05$). Le même effet a été observé pour l'extrait sec total. Pour les deux caractères les individus homozygotes AA ont montré un potentiel plus important que celui observé chez les homozygotes BB. Les hétérozygotes ont montré un potentiel intermédiaire entre les deux autres. Pour la teneur en matière protéique et en lactose on n'a pas noté un effet d'aucun des génotypes identifiés. Les valeurs moyennes pour la matière protéique ou pour le lactose sont insensibles aux génotypes des individus analysés. Komizarek et al. (2006) ont également trouvé que le génotype AA est caractérisé par une teneur élevée significative de protéines, matière grasse et quantité de lait produit par rapport aux autres génotypes.

La présence de l'allèle A est corrélé avec un lait de bonne qualité nutritionnelle de point de vue teneur en matière grasse et en composants fins.

Selon notre étude, le score des cellules somatiques sont affectées significativement par le génotype ($p < 0.05$). On a pu déduire que les homozygotes AA ont la teneur la plus élevée. L'analyse statistique a montré un effet significatif du génotype sur score des cellules somatiques avec $p=0.02\%$. Siham et al. (2011) ont interprété que l'allèle à haut rendement laitier a contribué positivement à les scores de cellules somatiques SCS ce qui est le cas pour nous. Selon (Hasret et al. 2009), le score de cellules somatiques est élevé chez les homozygotes BB chez les races anatoliennes du SUD alors qu'elle est plus élevée chez les homozygotes AA chez les races anatoliennes de l'EST.

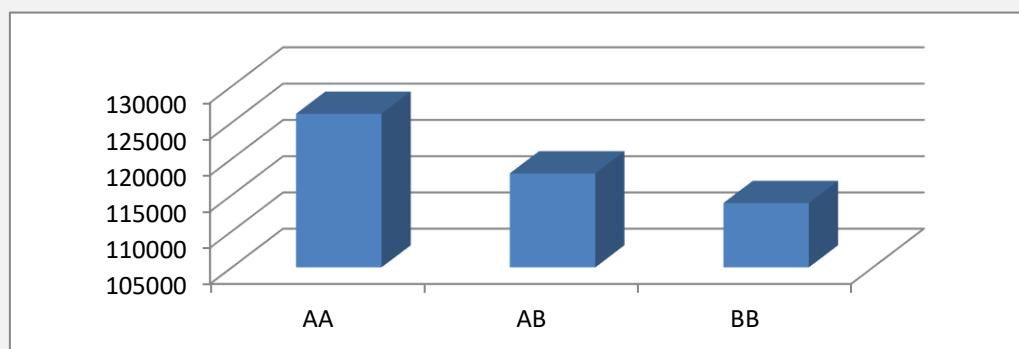


Figure 1. Score de cellules somatiques par génotype

4. Conclusion

Le troupeau laitier a présenté une production laitière moyenne de l'ordre de 21.32 (6.7) Kg/ vache présente/jour. La teneur moyenne en matière grasse (MG) était de 3.41 (0.67)%, celle de matière protéique (MP) était de l'ordre de 3.16 (0.34)%.

La teneur en lactose était de l'ordre de 4.7 (1.2) %, l'extrait sec total (EST) était de 12.3 (3.2) %.

Le nombre de cellules somatiques égales à une moyenne de 124882 (189625) cellules/ml de lait produit. L'amplification des régions codante pour cette protéine par des amorces spécifique a généré des bandes de taille 501 pb. Les individus AA ; BB et AB ont été représentés respectivement par 6.8 % ; 83.2 % et 10 %. Soit des fréquences alléliques de 12 % et 88 % respectivement pour les allèles A et B. La présence de l'allèle A est corrélé avec un lait de bonne qualité nutritionnelle de point de vue teneur en matière grasse et en composants fins. L'analyse statistique a montré un effet significatif du génotype sur les cellules somatiques.

5. Références

- Bouraoui R, Jemmali B, Riahi I, Ben Salem M, Chebbi I et Rekik B (2013)** Le score des cellules somatiques du lait affecte les performances de reproduction chez la vache Holstein en Tunisie. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 25,201.
- Bouraoui R, Selmi H, Mekni A, Chebbi I et Rouissi H (2014)** Impact des conditions de logement et des pratiques de traite sur la santé mammaire et la qualité du lait de la vache laitière en Tunisie. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 26,55.
- Komisarek J, Antkowiak I, Pytlewski J, Dorynek Z, Waoekowicz K (2006)** Effect of polymorphism in gene *btn1a1* on somatic cell count in milk of jersey cows. Vol. 15/56, SI 1, pp. 101–105.
- Sambrook J, Fritsch E, F, Maniatis T (1989)** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA.
- Seyfert H,M, Kuhn C (1994)** Characterization of a first bovine lactoferrin gene variant, based on an *EcoRI* polymorphism. *Animal Genetics*, 25, 54.