

Study of the genetic polymorphism of SLC11A1 gene and its effect on resistance – sensibility to bovine tuberculosis in Tunisia

Etude du polymorphisme génétique du gène SLC11A1 et son effet sur la résistance –sensibilité à la Tuberculose bovine en Tunisie

S. BEJAOU¹, M. JBEL², A. JAYYAR³, B. JEMMAL³, A. BEN GARA³

¹Institut National Agronomique 43, Avenue Charles Nicoles 1082, Tunis-Mahrajène, Tunisia

²Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire de Sidi Thabet, Devisions de contrôle vétérinaire - Ministère de la Défense Nationale, Tunisie

³Laboratory of Improvement and Integrated Development of Animal Productivity and Food Resources, Mateur - Higher School of Agriculture, University of Carthage, Tunisia

*Corresponding author: jemmali.bayrem@gmail.com

Abstract- This study aimed to uncover the association between tuberculosis and the polymorphism of a gene playing an important role in resistance / sensitivities to this disease. In order to study the polymorphism of the gene encoding SLC11A1, the extraction of genomic DNA was carried out by the salt method and by the analytik jena kit for a total of 30 samples. Only 10 samples, containing affected individuals, underwent specific primer amplification. PCR yielded amplifias of 374 Pb size, these samples were subsequently digested by the PCR-RFLP method with the restriction enzyme PstI. Two genotypes CC and CG, with an allelic frequency of 0.85 and 0.15 for the C and G allele respectively, were revealed. CC homozygous individuals show resistance to the disease, the observed mutation C>G can intervene in the control of the resistance / sensitivity of the individual to the tuberculin reaction but the results obtained are insufficient to confirm the association between the polymorphisms SLC11A1 and susceptibility to tuberculosis.

Key words: Bovine tuberculosis; SLC11A1; Polymorphism; Resistance, Sensitivity PCR-RFLP

Resumé- L'objectif de la présente étude consiste a dévoilé l'association entre la tuberculose et le polymorphisme de l'un des gènes qui joue un rôle important dans la résistance /sensibilités à cette maladie. Afin d'étudier le polymorphisme du gène codant la SLC11A1, l'extraction de l'ADN génomique a été réalisée par la méthode saline et par le kit analytik jena pour un total de 30 échantillons. 10 échantillons, contenant des individus atteints, seulement ont subi l'amplification par l'amorce spécifique. La PCR a permis d'obtenir des amplifias de taille 374 Pb, ces échantillons ont subi par la suite une digestion par la méthode PCR-RFLP avec l'enzyme de restriction PstI. Deux génotype CC et CG, avec une fréquence allélique de 0.85 et 0.15 pour l'allèle C et G respectivement, ont été révélés. Les individus homozygotes CC montrent une résistance à la maladie, la mutation observé C >G peut intervenir dans le contrôle de la résistance / sensibilité de l'individu à la réaction tuberculique mais les résultats obtenus se trouve insuffisant pour confirmer l'association entre les polymorphismes SLC11A1 et la susceptibilité à la tuberculose.

Mots clés : Tuberculose bovine ; SLC11A1 ; Polymorphisme ; Resistance, Sensibilité PCR-RFLP

1. Introduction

Dans les pays en voie de développement, l'élevage représente l'un des principaux piliers de l'économie nationale. Son importance tient à ses aspects économiques, sociaux et alimentaires (samba 2009). C'est bien le cas en Tunisie, où l'élevage bovin particulièrement représente une composante importante de la production agricole. La population autochtone présente des critères d'adaptation à l'environnement, aux ressources alimentaires disponibles et aux modes de gestion et aussi au contexte pathologique. Cependant, vu la demande excessif des habitants en produits animaux , il y a eu l'introduction anarchique des races exotiques et ainsi la population locale a subi plusieurs croisements à fin d'améliorer la production ce qui a provoqué la dégradation de leur importance et l'effondrement de leur effectif, aussi ces modifications ont affectés considérablement la structure génétique du cheptel présent aujourd'hui ce qui a favorisé la propagation de plusieurs maladies contagieuses et devient alors une catastrophe sanitaire (grandes épizooties, zoonoses...) qui s'accroît de jour en autre . La tuberculose



bovine est une maladie infectieuse, contagieuse, connue depuis très longtemps mais elle reste majoritairement non déclarée ce qui rend ce problème de plus en plus grave sans aucune initiative d'éradication définitive. La plupart des recherches antérieures sur la TB bovine étaient principalement axées sur les facteurs de risque environnementaux d'infection par cette maladie alors qu'une attention limitée était accordée à l'identification de facteurs génétiques possibles chez l'hôte bovin. En général, les études génomiques réalisées à ce jour n'ont révélé aucun QTL commun majeur pour cette maladie (Kethusegile et al. 2017). C'est seulement au bout des dernières décennies, que le secteur de l'élevage bovin a connu un développement considérable, et suite aux progrès en bioinformatique et en génie génétique et leur intégration dans le monde animale qu'on a commencé à chercher des solutions sérieuses pour cette maladie et mettre une limite à leur propagation, ainsi il y a eu un intérêt scientifique croissant de l'usage de l'information génomique comme un outil supplémentaire dans les programmes potentiels d'amélioration génétique dans l'élevage. Les études de la diversité génétique devraient permettre une meilleure compréhension de la résistance/ sensibilité à cette maladie et une meilleure conception de programmes d'amélioration et de sélection des races pour éradiquer cette maladie zoonotique. L'identification du polymorphisme génétique est alors un moyen très efficace pour évaluer cette diversité et étudier les caractéristiques génétiques des bovins afin de sélectionner les meilleurs individus qui nous permettent de construire des cheptels indemnes. L'objectif de ce travail est d'étudier l'association entre le polymorphisme des gènes codants pour la tuberculose, cas du gène SLC11A1, et la résistance / sensibilité du cheptel à cette maladie et la prévalence dans notre pays à fin d'élaborer une voie promoteur pour la sélection des géniteurs ce qui permet de minimiser l'impact sanitaire et économique de la tuberculose en TUNISIE.

2. Matériels et méthodes

2.1. L'échantillonnage

Le matériel biologique utilisé pour l'extraction de l'ADN est du sang des bovins. 150 échantillons à partir du quelle il y a 100 échantillons sains qui ont été prélevés à partir de la ferme ESA Mateur et le Complexe RAS ELEIIN MATEUR et 50 tuberculeux qui ont été prélevés d'une ferme privée SMVDA BORDJ ETOUMI. Les échantillons du sang ont été prélevés dans des tubes sous vide de 5 ml contenant l'acide éthylène-diamine-tétra-acétique (EDTA) anticoagulant en utilisant une aiguille à usage unique pour éviter la contamination. Par la suite les échantillons ont été conservés au froid dans une caisse isotherme jusqu'au transport au laboratoire le plus tôt possible où ils étaient conservés à une température de -20°C avant l'extraction de l'ADN.

2.2. Extraction d'ADN

L'ADN génomique a été extrait à partir d'un kit d'extraction (analytik jena) commerciale, selon le protocole recommandé. Le protocole de ce kit comporte six étapes essentielles : lyse des globules, élimination de l'ARN, fixation de l'ADN, lavage, élimination de l'éthanol et l'élution d'ADN. La séparation de l'ADN en fonction de leur poids moléculaire (PM) a été réalisée par électrophorèse sur un gel d'agarose à une concentration de 0.8 %.

2.3. Protocole de PCR-RFLP

L'amplification de la séquence cible a été faite par la technique la réaction polymérase en chaîne (PCR) en utilisant un mélange réactionnel contenant des amorces spécifiques pour chaque gène étudié (Tableau 1 et 2).

Tableau 1. Les amorces de la séquence cible du gène SLC11A1

Gène	Amorces	Taille PCR
SLC11A1	AF : 5'- ATCTCCTTCTACTGCCCCG-3' AR : 5'-CACAAACTGTCCCGCGTAC-3'	374 pb

F : amorce sens ; R : anti-sens. (Baqir et al.,2015)

Tableau 2. Le volume de chaque composant du mélange réactionnel de la réaction PCR

Composants	Concentration initiale	Vi (µl) / un échantillon
Tampon (buffer)	10X	2.5
MgCl ₂	50mM	1.25
dNTP	100mM	2.5
Amorce sens	25mM	2.5
Amorce anti-sens	25mM	2.5
Taq polymérase	5U/µl	0.25
Volume d'eau autoclavée	-	11.5
Volume mix	-	23
ADN génomique	-	2
Volume total	-	25

La PCR comporte un cycle de trois phases à différentes températures et différentes durées : la première phase est une phase de dénaturation de la séquence cible à double brin à 95°C pendant 40s ; la deuxième phase est une phase d'hybridation de la séquence cible à simple brin à 55°C pendant 40s ; la troisième phase est une phase d'élongation qui dure 40s sous une température de 72°C. Les amplifias ont été digérés par des enzymes de restriction PstI (Tableau 3) par la technique de détection des mutations connues, le polymorphisme de longueur des fragments de restriction.

Tableau 3 : l'enzyme de restriction et la température d'hybridation

Gène	Enzyme de restriction	T° de digestion	Références
SLC11A1	PstI	37°C	

Les mutations ponctuelles au niveau de la séquence cible ont été détectées par la technique RFLP. L'enzyme de restriction **PstI** a été mise en jeu d'hydrolysé le produit PCR dans un milieu réactionnel qui contient : 2.5 µl du tampon, 0.3 µl de l'enzyme, 12 µl des amplifias (produits PCR) et 10.2 µl du dH₂O. Ce mélange a été incubé à 37 °C pendant 12 heures. Les produits de digestion ont été séparés sur un gel d'agarose de 2 %. Coloré avec du Gelstain et ont été visualisés sous lumière UV.

3. Résultats et discussion

3.1. Extraction de l'ADN génomique et évaluation du protocole de PCR-RFLP

Une électrophorèse analytique sur gel d'agarose à 1% a été réalisée pour tous les échantillons. Cette étape a permis l'évaluation de la qualité et de la quantité d'ADN extrait. A la visualisation sous les rayons d'ultraviolet (UV), les prélèvements traités se sont révélés de bonne qualité puisque les bandes étaient nettes, intenses et dépourvues d'ADN dégradé. La figure 1 illustre le profil électrophorétique de quelques échantillons traités. A la visualisation du profil électrophorétique des amplifias du gène étudié dans notre présente étude sous les rayons UV, on visualise des bandes nettes et intense qui nous montre le bon fonctionnement de la réaction polymérase en chaîne (figure 2). Le bon déroulement de la PCR dépend essentiellement de l'optimisation de la température d'hybridation et de la concentration des désoxyribonucléotides (dNTP).

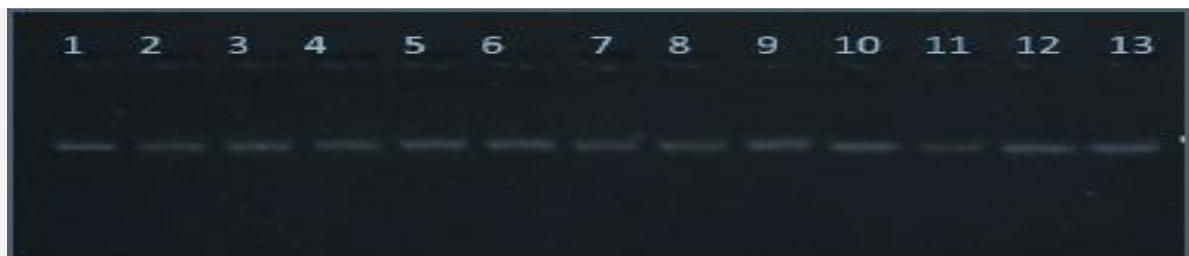


Figure 1. Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 1% des échantillons d'ADN génomique des individus analysés.

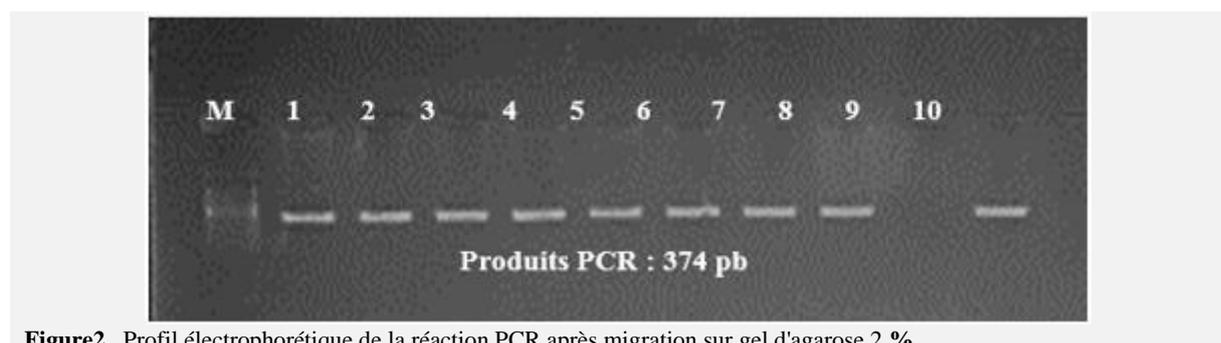


Figure2. Profil électrophorétique de la réaction PCR après migration sur gel d'agarose 2 %

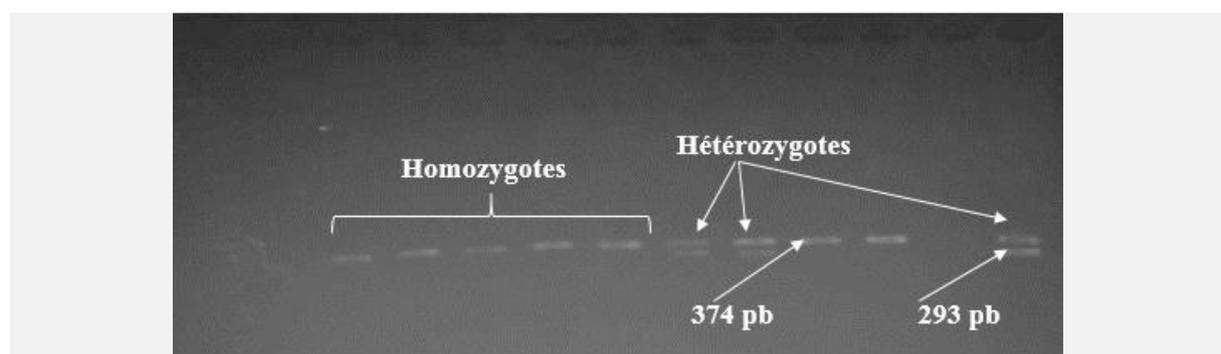


Figure 3. Profil de digestion des produits d'amplification du gène SLC11A1 avec l'enzyme PstI sur gel d'agarose 2.5%

3.2. Fréquences génotypiques et fréquences alléliques

Les produits amplifiés ont été digérés par l'enzyme de restriction PstI dont le site de restriction est 5'CTGCAG3'. La présence du site de restriction indique la présence de la mutation

Dans notre cas l'enzyme utilisée pour le génotypage au niveau du locus rs109453173 de SNP C/G du gène SLC11A1 a permis de distinguer :

- **Génotypes homozygotes sauvages** : présentent tous des bandes de taille 374 pb, ce sont les mêmes bandes présentées par le PCR, on peut dire ainsi ces individus de génotype C//C ne présentent pas la mutation responsable de la susceptibilité/résistance à la tuberculose.
- **Génotypes hétérozygotes** : ils présentent deux bandes de tailles différentes dont l'une de ces bandes est la bande de produit PCR de taille 374 pb et l'autre bande est de taille 293 pb, on peut dire que ces individus de génotype C//G présentent la mutation responsable de la susceptibilité / résistance à la maladie.

Nos résultats, sont en accord avec ceux trouvés par **Baqir et al. (2015)** au sein d'un cheptel indien, alors qu'elles ne concordent pas avec ceux trouvés par **K liu et al. (2016)**, au Chine, où le polymorphisme génétique du gène SLC11A1 a montré deux fragments contenant 633 pb et 303 pb pour les génotypes GG et TT; deux fragments contenant 709 pb et 227 pb pour les génotypes CC et AA; quatre fragments contenant 709 pb, 406 pb, 303 pb et 227 pb pour les génotypes CG et l'AT; et quatre fragments contenant 709 pb, 633 pb, 303 pb, et 227 pb pour les génotypes CG et AA.

D'après les résultats de digestion on a obtenu des individus homozygotes de génotype C//C qui sont jugés sains donc ce génotype marque des individus résistants à la réaction tuberculinique ce qui nie les résultats trouvés par **Baqir et al. (2015)**, en revanche notre résultat concorde avec celui obtenu par **liu et al. (2016)** qui ont trouvé que le génotype C//C pourrait conférer une importance résistance à la tuberculose et identifie ainsi un phénotype sain.

Nos hypothèses peuvent être confirmées si on augmente l'effectif testé et si on obtient un test d'intradermo qui confirme que cet individu prévu sain phénotypiquement est atteint. Ainsi on peut considérer que la mutation C > G joue un rôle dans la susceptibilité à la tuberculose et le génotype hétérozygote marque des individus sensibles à la réaction tuberculinique.

Ce résultat sera contradictoire avec celui trouvé par **liu et al. (2016)** qui admet que le génotype C//G peut être aussi résistant à la tuberculose donc on peut déduire, Des associations significatives entre les polymorphismes SLC11A1 et la sensibilité à la tuberculose ont été tels qu'il est rapporté par **Pinedo et al (2009)**.

En effet, dans une étude chez l'homme, la mutation G> C de l'intron 4 du gène NRAMP1 a été rapportée comme facteur susceptible de causer la paratuberculose (**Qu et al. 2006**) par contre, des études chez des Russes ont révélé que G/C (INT4) polymorphisme n'est pas associé à la tuberculose (**Puzyrev et al. 2002**) donc ce n'est pas Toutes les études supportent une association entre les polymorphismes SLC11A1 et la susceptibilité à l'infection à M. bovis et il est important de noter que le phénotype sensible est dû à une substitution de nucléotide qui entraîne un changement d'acide aminé plutôt qu'à un polymorphisme dans les séquences de microsatellites (**Paixão et al. ,2006**).

Tableau 4. Fréquence génotypique et allélique du gène SLC11A1

Effectif	Locus du gène SLC11A1 : rs 109453173			
	Fréquences génotypique		Fréquences alléliques	
150	CC	CG	C	G
	0.72	0.25	0.85	0.15

Pour le gène SLC11A1 on a compté deux allèles C et G où la dominance de l'allèle C'est très remarquable avec une fréquence allélique de 0.85. Cependant En Inde ils ont trouvé une fréquence dominante pour l'allèle G **Baqir et al (2015)**, contrairement dans la Chine la dominance c'était pour l'allèle C **liu et al. (2016)**, à partir de ces résultats on peut conclure qu'il y a une association entre l'allèle C et la résistance à la maladie ce qui concorde avec le résultat trouvé par **Cheng et al. (2015)**.

→A ce propos on peut confirmer l'existence d'une mutation au niveau du gène SLC11A1 qui est une substitution de l'allèle C par l'allèle G au niveau du locus rs 109453173, qui a engendré deux génotypes le premier est homozygote sauvage C//C le deuxième est hétérozygote C//G.

Cette mutation peut avoir un rôle dans l'association du SLC11A1 avec la résistance /sensibilité à la réaction tuberculinique Mais ces résultats nécessitent une validation supplémentaire par des marqueurs sur une population plus large en incluant peu de tests de diagnostic de confirmation supplémentaires.

4. Conclusion

Pour le gène SLC11A1 on a compté deux allèles C et G où la dominance de l'allèle C'est très remarquable avec une fréquence allélique de 0.85.

On peut considérer que la mutation C > G joue un rôle dans la susceptibilité à la tuberculose.

5. Références

- Baqira Mohd, Saket Bhushanb, Amit Kumara, Arvind Sonawanea, Ranvir Singha, Anuj Chauhana, Ramji Yadava et al. 2015.** Association of polymorphisms in SLC11A1 gene with bovine tuberculosis trait among Indian cattle
- Baqir, Ashish Bhaladhare, Deepak Sharma, Amit Kumar, Arvind Sonwane, Anuj Chauhan, Ranvir Singh, Pushpendra Kumaret al., 2016.** Single nucleotide polymorphisms in toll-like receptor genes and case-control association studies with bovine tuberculosis
- Cheng Y, Huang C, Tsai HJ, 2015.** Relationship of Bovine SLC11A1 (Formerly NRAMP1) Polymorphisms to the Risk of Bovine Tuberculosis in Holstein Cattle. *J Veterinar Sci Technol* 6:247. doi:10.4172/2157-7579.1000247
- Liu W, Cao WC, Zhang CY, Tian L, Wu XM, et al., 2004.** VDR and NRAMP1 gene polymorphisms in susceptibility to pulmonary tuberculosis among the Chinese Han population: a case-control study. *Int J Tuberc Lung Dis* 8: 428-434.
- liu Kaihua a, Bin Zhang a, Zhaochun Teng a, Youtao Wang a, Guodong Dong b, Cong Xu c , Bo Qin a , Chunlian Song a , et al., 2016.** Association between SLC11A1 (NRAMP1) polymorphisms and Q4 susceptibility to tuberculosis in Chinese Holstein cattle
- Puzyrev VP, Freidin MB, Rudko AA, Strelis AK, Kolokolova OV, 2002.** Polymorphisms of the candidate genes for genetic susceptibility totuberculosis in the Slavic population of Siberia: a pilot study. *Mol Biol*, 36 :788–791.
- Samba Tew DIAGNE,2009.** Contribution à l'étude de la tuberculose bovine aux abbatoir du Dakkar (sénégal), identification biochimique et biomoléculaire de 9 souches de mycobactéris 200101 carcasse inspécté de 2005 à 2008
- Kethusegile Raphaka, Oswald Matika, Enrique Sánchez-Molano, Raphael Mrode, Mike Peter Coffey, Valentina Riggio, et al. ,2017 .** Genomic regions underlying susceptibility to bovine tuberculosis in Holstein-Friesian cattle