

Estimation de paramètres génétiques et détection de QTL liés à des caractères de fertilité mâle, de production de semence et de qualité de la semence chez le taureau laitier.

B. BASSO (1), S. FRITZ (1), T. DRUET (2), F. GUILLAUME (2), M.N. ROSSIGNOL (3), Y. AMIGUES (3), R. GABRIEL (4), E. SELLEM (4), L. SALAS-CORTES (4), P. HUMBLLOT (4), X. DRUART (5).

(1) UNCEIA Département Fédéral, 149 rue de Bercy, 75595 Paris Cedex 12, France

(2) INRA Station de Génétique Quantitative et Appliquée, 78352 Jouy-en-Josas, France

(3) GIE LABOGENA, 78352 Jouy-en-Josas, France

(4) UNCEIA Département R&D, 13 rue Jouët, 94703 Maisons-Alfort, France

(5) INRA Physiologie de la Reproduction et des comportements, 37380 Nouzilly, France

RESUME - En race Prim'Holstein, la baisse de fertilité au cours des dernières années s'est accompagnée d'un accroissement de son importance économique. Le taureau d'insémination artificielle (IA) a une influence sur la réussite à l'IA et donc sur la fertilité. Cependant la valeur d'un taureau pour cette composante mâle de la fertilité est connue le plus souvent après qu'un grand nombre d'IA ait été réalisé. De plus, l'héritabilité de la fertilité mâle est très faible. Il apparaît donc judicieux d'utiliser des indicateurs supplémentaires de la fertilité mâle comme les mesures de production ou de qualité de semence. Néanmoins, ces caractères sont parfois plus difficiles ou coûteux à mesurer. Dès lors, l'utilisation en sélection assistée par marqueurs d'éventuels QTL affectant les caractères de fertilité mâle pourrait être particulièrement bénéfique. Un dispositif de détection de QTL de 515 taureaux Prim'Holstein appartenant à 10 familles a donc été mis en place. Celui-ci s'intéresse à la fertilité mâle évaluée par différents Taux de Non Retour en chaleur (TNR) à 28, 56, 90 et 282 jours, à des variables de production de semence (volume, concentration et nombre de spermatozoïdes par éjaculat) et à des variables de qualité de semence (motilité, pourcentage de spermatozoïdes viables et vitesse des spermatozoïdes). Les paramètres génétiques estimés par la méthode du maximum de vraisemblance restreint (REML) confirment l'héritabilité très faible pour les TNR (0,005 à 0,008) alors que les héritabilités estimées des caractères de production de semence (0,13 à 0,31) et de qualité de semence (0,16 à 0,27) sont plus élevées. Les corrélations entre les variables de chaque catégorie (fertilité, production de semence et qualité de semence) sont toujours élevées. La détection de QTL a été appliquée avec une couverture de 150 marqueurs sur l'ensemble du génome. 1 à 3 QTL ont été détectés pour chacun des caractères et, sur les chromosomes 8 et 11, des QTL ont même été détectés pour plusieurs caractères. Cette étude de primo-localisation, avec des intervalles de confiance relativement larges, est la première étape de recherches visant à cartographier ces QTL et à déterminer leurs actions.

Estimation of genetic parameters and genome scan for QTL influencing male fertility, semen production and semen quality traits of dairy bulls.

B. BASSO (1), S. FRITZ (1), T. DRUET (2), F. GUILLAUME (2), M.N. ROSSIGNOL (3), Y. AMIGUES (3), R. GABRIEL (4), E. SELLEM (4), L. SALAS-CORTES (4), P. HUMBLLOT (4), X. DRUART (5).

(1) UNCEIA Département Fédéral, 149 rue de Bercy, 75595 Paris Cedex 12, France

SUMMARY - In the Holstein breed, the decline of fertility observed during recent years has resulted in an increase of its economic importance. Bulls used for artificial insemination (AI) influence the success of AI and consequently fertility. However, the value of a bull for this male component of fertility can be estimated only after many AI are performed. In addition, male fertility has a very low heritability. It is therefore indicated to use additional male fertility measures such as semen production or quality. These traits can be more difficult or more expensive to record. Therefore, the use of QTL affecting male fertility in marker-assisted selection could be particularly beneficial. A QTL detection design including 515 Holstein bulls distributed over 10 sire families was set up. The traits involved in this study were male fertility evaluated by various non-return rates (NR) at 28, 56, 90 and 282 days, semen production variables (volume, concentration and number of spermatozooids per ejaculate) and semen quality variables (motility, percentage of viable spermatozooids, speed and osmotic resistance). The genetic parameters estimated by Restricted Maximum Likelihood (REML) confirmed the very low heritability of NR (0.005 to 0.008) whereas estimated heritability of semen production (0.13 to 0.31) and semen quality (0.21 to 0.71) were higher. The correlations within each category (fertility, semen production and semen quality) were always high. One hundred and fifty markers covering the whole genome were used for QTL detection. One to 3 QTL were detected for each trait. On the chromosomes 8, 11, 15 and 18, QTL were even detected for several traits. These first QTL location results, with relatively wide confidence intervals, are only a first step and further research is required to fine map those QTL and to understand their action.

INTRODUCTION

Chez les bovins laitiers et principalement en race Prim'Holstein, la sélection des reproducteurs a permis une forte amélioration des performances laitières du troupeau national. Mais parallèlement, les performances de reproduction se sont dégradées, ce qui a évidemment un impact économique négatif pour les éleveurs et les unités de sélection.

Depuis quelques années, une évaluation génétique de la "fertilité femelle" des reproducteurs a été mise en place en France à partir des taux de réussite à l'insémination artificielle mesurés sur les filles de ces taureaux. En revanche, la composante mâle de la fertilité, fertilité propre du taureau, qui peut être définie comme l'aptitude de leur semence à féconder et à donner un embryon viable, n'est pas connue et n'est pas évaluée actuellement en routine au niveau national.

Dans le même temps, au niveau des Centres de Production de Semence (CPS), on cherche à conserver une quantité et une qualité convenable de semence produite par unité de temps et de travail. Des examens de semence bovine sont déjà effectués en routine par les CPS pour évaluer la viabilité des spermatozoïdes et éliminer les échantillons jugés peu propices à assurer la réussite des inséminations artificielles. Toutefois les corrélations génétiques entre les différents critères mesurables en laboratoire et la fertilité des taureaux sont assez mal connues.

De plus, la plupart des caractères de reproduction, en particulier la fertilité mâle, sont des caractères difficiles à mesurer et/ou à sélectionner (faible héritabilité). L'accès au génome et plus précisément la détection de QTL (*Quantitative Trait Locus*), régions chromosomiques associées à des variations significatives sur un caractère quantitatif, ouvre de nouvelles perspectives en sélection pour de tels caractères.

L'ensemble de ces éléments a amené l'UNCEIA et l'INRA à mettre en place un protocole pour estimer les paramètres génétiques des différents caractères liés à la fertilité mâle, à la production de semence et à la qualité de semence du taureau laitier et à envisager par la suite des détecteurs de QTL afin d'évaluer les possibilités d'intégration de certains de ces caractères dans le programme de Sélection Assistée par Marqueurs mis en place chez les bovins laitiers depuis 2000 (Fritz, 2003).

1. PROTOCOLE DE L'ETUDE

1.1. POPULATION

Cette étude s'appuie sur un dispositif de 515 taureaux Prim'Holstein répartis dans 10 familles de père. Ces taureaux sont nés entre 2000 et 2002 et sont pour la plupart toujours en station dans l'attente des résultats de testage sur descendance.

Tableau 1 : population de l'étude

Famille	Nbre de fils étudiés
ADDISON	50
BRETT	51
DUTCH BOY	54
HERALD	40
HERSHEL	52
JESTHER	50
JOCKO BESN	61
LANTZ	51
MARSHALL	66
TRENT	40

1.2. GENOTYPAGES

L'ensemble des mâles du dispositif ainsi qu'une partie des mères ont été préalablement génotypés sur les 43 marqueurs microsatellites du programme de Sélection Assistée par Marqueurs (Fritz, 2003). Dans le cadre plus spécifique de cette étude, ces mêmes animaux ont été génotypés par le GIE LABOGENA sur un complément d'une centaine de marqueurs microsatellites permettant de couvrir l'ensemble du génome (Ihara *et al.*, 2004). Au total, les animaux ont été génotypés sur 2 à 10 marqueurs par chromosome. La valeur moyenne par chromosome de la probabilité d'hétérozygotie d'un individu (PH) à un marqueur a été calculée (Shete *et al.*, 2000). Celle-ci reflète l'informativité des marqueurs.

Tableau 2 : répartition et informativité des marqueurs

Chromosome (BTA)	Distance couverte (cM Haldane)	nombre marqueurs	PH moyenne
1	127	6	0,61
2	103	5	0,70
3	115	6	0,59
4	93	4	0,61
5	116	4	0,67
6	127	7	0,60
7	109	10	0,56
8	118	5	0,64
9	95	3	0,67
10	101	6	0,72
11	119	4	0,52
12	110	6	0,69
13	90	5	0,64
14	100	5	0,60
15	81	10	0,71
16	93	5	0,66
17	75	4	0,67
18	84	5	0,63
19	107	6	0,71
20	70	5	0,52
21	100	5	0,69
22	76	4	0,64
23	64	5	0,65
24	16	2	0,66
25	51	3	0,69
26	39	8	0,61
27	58	4	0,47
28	11	2	0,53
29	66	4	0,53
XY	17	2	0,65

1.3. MESURES PHENOTYPIQUES

1.3.1. Fertilité mâle

Les données nationales d'inséminations artificielles ont été utilisées au niveau de la Station de Génétique Quantitative et Appliquée de l'INRA pour évaluer la fertilité des taureaux. Des données de taux de non retour en chaleur (TNR) des vaches à 28, 56, 90 et 282 jours après inséminations, corrigées pour les autres effets du modèle officiel, ont pu être obtenues pour 495 taureaux du protocole (Guillaume *et al.*, 2005). Une valeur est calculée par taureau pour chaque campagne.

1.3.2. Production de semence

Les données mesurées en routine par les CPS (volume, concentration et nombre de spermatozoïdes par éjaculat) étaient disponibles pour 478 taureaux. Seules les informations récoltées sur ces taureaux lors du premier sautréalisé entre 12 et 18 mois d'âge ont été conservées dans le cadre de cette étude.

1.3.3. Qualité de la semence après décongélation

Des mesures élaborées de qualité de la semence après décongélation ont été réalisées au niveau du département R&D de l'UNCEIA à partir de doses utilisées pour la mise en testage des taureaux. Des mesures de motilité et de vitesses des spermatozoïdes ont été évaluées avec un appareil de mesures automatisées HTM (*Hamilton Thorn Motility*) permettant des mesures objectives et précises. Le pourcentage de spermatozoïdes viables après décongélation a pu être estimé par cytométrie de flux. Enfin les principales anomalies morphologiques des spermatozoïdes ont été dénombrées en phase liquide.

Dans le cadre de cette étude préliminaire, seules les informations relatives à 333 taureaux correspondant à 7 familles du protocole ont pu être analysées.

2. ANALYSES STATISTIQUES

Les analyses ont été réalisées à l'aide de programmes dérivés des logiciels de Misztal *et al.*, (2002) et développés à la Station de Génétique Quantitative et Appliquée de l'INRA.

Les performances décrites dans les paragraphes précédents ont été analysées avec le modèle mixte suivant :

$$y_{ij} = \text{cps} + \text{cps}*\text{sa} + \text{us}*\text{ag} + g_i + \text{ep}_i + e_{ij} \quad (1)$$

où :

y_{ij} : performance j du taureau i

cps : effet fixe CPS

cps*sa : effet fixe de l'interaction CPS*saison de récolte

us*ag : effet fixe de l'interaction unité de sélection*âge lors de la récolte

g_i : effet aléatoire de la valeur génétique du taureau i

ep_i : effet aléatoire de l'environnement permanent associé au taureau i

e_{ij} : valeur résiduelle j associée au taureau i

Pour les mesures de qualité de la semence, les effets fixes ont été remplacés par un effet CPS et un effet dilueur. Enfin pour les TNR, seul un effet fixe année a été conservé.

Ce premier modèle a permis d'estimer les paramètres génétiques (héritabilité et corrélations) par la méthode d'estimation du maximum de vraisemblance restreint (REML). Ensuite, un effet gamétique a été ajouté au modèle (1) :

$$y_{ij} = \text{cps} + \text{cps}*\text{sa} + \text{us}*\text{ag} + g_i + \text{ep}_i + v_i^p + v_i^m + e_{ij} \quad (2)$$

où v_i^p et v_i^m sont respectivement les effets de l'allèle paternel et maternel au QTL du taureau i.

Ce second modèle est appliqué tous les cM le long de chaque chromosome pour tester la présence d'un éventuel QTL. La comparaison des vraisemblances des modèles (1) et (2) permet d'estimer si l'existence d'un QTL à la position testée est significative ou non.

3. RESULTATS

Liste des abréviations utilisées pour les caractères étudiés :

- Nb spz : nombre de spermatozoïdes par éjaculat
- % spz viables : pourcentage de spermatozoïdes viables après décongélation
- Vitesse spz : vitesse linéaire des spermatozoïdes
- Motilité spz : motilité des spermatozoïdes

3.1. PARAMETRES GENETIQUES

La composante mâle de la fertilité estimée à partir des TNR possède une héritabilité très faible (tableau 3). Cela indique que les variations de réussite à l'IA observées entre taureaux sur une campagne donnée sont principalement dues à des facteurs non génétiques.

Tableau 3 : héritabilités (sur la diagonale) des TNR et corrélations phénotypiques entre TNR.

	TNR28	TNR56	TNR90	TNR282
TNR28	0,005	0,89	0,85	0,84
TNR56	0,89	0,006	0,95	0,93
TNR90	0,85	0,95	0,008	0,97
TNR282	0,84	0,93	0,97	0,008

Les caractères de production de semence et de qualité de la semence après décongélation possèdent des héritabilités comprises entre 0,13 et 0,31 (tableau 4 et 5). Ce sont donc des caractères avec des héritabilités plus élevées que celles qui sont observées sur les TNR. En ce qui concerne les caractères de production de semence, la corrélation génétique négative entre volume et concentration (-0,37) est comparable à celle obtenue par Ducroq et Humblot (1995). Le nombre de spermatozoïdes étant une fonction des deux premiers caractères, il est logique qu'il soit corrélé positivement avec eux. Pour les caractères de qualité de semence, la corrélation élevée entre motilité des spermatozoïdes et pourcentage de spermatozoïdes viables après décongélation semble cohérente.

Tableau 4 : héritabilités (sur la diagonale), corrélations génétiques (au dessus de la diagonale), phénotypiques (en dessous de la diagonale) entre caractères de production de semence.

	Volume	Concentration	Nb spz
Volume	0,31	-0,37	0,62
Concentration	0,11	0,24	0,50
Nb spz	0,60	0,74	0,13

Tableau 5 : héritabilités (sur la diagonale), corrélations génétiques (au dessus de la diagonale), phénotypiques (en dessous de la diagonale) entre caractères de qualité de la semence.

	Motilité spz	% spz viables	Vitesse spz
Motilité spz	0,21	0,88	-0,48
% spz viables	0,67	0,16	-0,10
Vitesse spz	0,09	0,04	0,27

Le calcul des corrélations génétiques entre les TNR et les autres caractères est complexe. Les TNR sont des données pré-corrigées d'un caractère à héritabilité extrêmement faible, chacun des caractères est décrit par un modèle distinct et les performances sont souvent une moyenne d'un nombre variable de mesures. Dès lors, l'informativité du dispositif n'est pas suffisante pour séparer les différents effets et estimer convenablement les corrélations génétiques entre tous ces caractères.

3.2. DETECTIONS DE QTL

Pour chaque caractère, de l'ordre de 1 à 3 QTL ont été détectés (tableau 6). Comme dans tout programme de primo-localisation de QTL, les intervalles de confiance de localisation de chacun de ces QTL restent importants : de 12 à 80 cM. De plus, certains QTL, comme le QTL de vitesse des spermatozoïdes du chromosome 4, sont détectés au niveau de l'extrémité de la région étudiée, ce qui sous-estime la taille de l'intervalle de confiance.

Sur deux des chromosomes où des QTL de TNR ont été détectés, d'autres QTL de production ou de qualité de semence ont également été détectés. Ainsi le QTL de concentration du chromosome 11 a été détecté à la même position qu'un QTL de fertilité mâle estimé à partir de TNR28 ou de TNR56. De même, les QTL de pourcentage de spermatozoïdes viables après décongélation et de TNR28 du chromosome 8 possèdent des intervalles de confiance qui se chevauchent. Toutefois à partir de ces analyses préliminaires, il est prématuré d'affirmer qu'il y a un lien entre ces QTL.

Tableau 6 : principaux QTL détectés

Chromosome (BTA)	Caractère (cM)	Localisation	Intervalle de confiance (cM)
Fertilité mâle			
8	TNR28	30	14 - 44
8	TNR282	28	12 - 44
11	TNR28	102	64 - 121
11	TNR56	97	60 - 121
14	TNR90	100	78 - 100
14	TNR282	100	73-100
18	TNR28	68	9 - 80
Production de semence			
11	Concentration	95	49 - 105
13	Concentration	64	15 - 91
13	Nb spz	42	10 - 80
15	Volume	23	15 - 42
21	Nb spz	41	30 - 95
21	Concentration	82	38 - 100
22	Volume	0	0 - 28
Qualité de la semence après décongélation			
2	Motilité spz	115	84 - 115
3	Vitesse spz	63	0 - 69
4	Vitesse spz	7	7 - 19
8	% spz viables	57	34 - 114
23	% spz viables	42	9 - 72

4. PERSPECTIVES

Pour affiner ces premiers résultats, des analyses multi caractères sont envisagées. D'une part, elles doivent permettre d'augmenter la puissance des détections et donc de confirmer l'existence de ces QTL. D'autre part, lorsque des QTL sont détectés sur un même chromosome et ce pour des caractères différents, comme les QTL de concentration et de nombre de spermatozoïdes du BTA21, ces analyses doivent permettre de distinguer s'il s'agit d'un QTL unique avec des effets sur les deux caractères ou bien s'il s'agit de

deux QTL distincts influant chacun des caractères. Un autre exemple intéressant à étudier en analyse multi caractères concerne le QTL de vitesse des spermatozoïdes après décongélation du BTA03. En effet, son intervalle de localisation contient à la fois un QTL de fertilité femelle confirmé sur ce même chromosome (Guillaume *et al.*, 2005) et l'anomalie génétique CVM (Bendixen *et al.*, 2001).

Suite à ces premiers résultats, des études de cartographie fine de QTL seront démarrées. L'objectif sera de réduire l'intervalle de confiance de localisation. Dans le même temps, des travaux de cartographie comparée avec une espèce modèle telle que la souris sont prévus. Par exemple, il semble que l'intervalle de confiance de localisation du QTL de Volume de l'éjaculat du BTA15 corresponde à une région du chromosome 9 murin (MMU9). L'inventaire des gènes candidats à ce QTL et leurs études seront alors plus rapides et souvent facilitées chez la souris. Dès lors que des gènes seront identifiés, il sera possible de les confirmer sur la population de l'étude et s'ils présentent un intérêt de les intégrer à des programmes de sélection assistée par marqueurs.

CONCLUSION

L'héritabilité de la fertilité mâle mesurée à partir des TNR est très faible. Par contre, pour les caractères de semence mesurés en station ou en laboratoire, elles sont plus élevées. Cette étude a permis de détecter 1 à 3 QTL pour chacun des caractères étudiés. L'utilisation de ces QTL en sélection pourrait s'avérer particulièrement intéressante étant donné la faible héritabilité du TNR ou le coût de certaines mesures. Cependant les liens entre les caractères étudiés et les TNR restent difficiles à déterminer. De nouvelles analyses sont nécessaires pour approfondir les relations entre ces caractères et améliorer les connaissances sur ces QTL.

Ce projet soutenu par le Groupement d'Intérêt Scientifique AGENAE est financé par le ministère de la recherche (FRT) et par le groupement APIS-GENE (appel à projets GENANIMAL 2003).

L'UNCEIA et l'INRA remercient les CPS de l'OGER, de MIDATEST, de l'UNECO et de l'URCEO pour leur collaboration active à ce projet.

Bendixen C., Svendsen S., Jensen H. et al., 2001. *Patent Application Publication*, Jul 8, 2004.

Ducrocq V., Humblot P., 1995. *Livestock Production Science*, 41, 1-10.

Fritz S., Colleau J.J., Druet T. et al., 2003. *Renc. Rech. Ruminants*, 10, 53-56.

Guillaume F., Ben-jemma S., Fritz S. et al., 2005. *Renc. Rech. Ruminants*, 12.

Ihara N., Takasuga A., Mizoshita K. et al., 2004. *Genome Research*, 14, 1987-1998.

Misztal I., Tsuruta T., Strabel T. et al., 2002. *7th WCGALP*, N°28-07.

Shete S., Tiwari H., Elston R.C., 2000. *Theoretical Population Biology*, 57, 265-271.