

Détection de la mutation C53Y du gène BMP15 en race ovine Lacaune par analyse HRM

Detection of the C53Y mutation on BMP15 gene in Lacaune sheep using HRM analysis

AMEZIANE G. (1), BRUGIDOU R. (1)

(1) Aveyron Labo, Z.A. Bel air, rue des artisans 12031 Rodez cedex 9, France

INTRODUCTION

La régulation des taux d'ovulation et de la prolificité présente une grande variabilité dans l'espèce ovine. Plusieurs mutations affectant ces critères zootechniques ont été identifiées. Pour le gène BMP15 situé sur le chromosome X, cinq mutations sont connues. Pour la race Lacaune viande où elle a été décrite, il s'agit de la mutation C53Y. L'analyse de la séquence montre une mutation de G en A sur le résidu 53 de la protéine BMP15 mature, ce qui conduit à une substitution de l'acide aminé Cystéine (TGT) par une Tyrosine (TAT).

Le mutation identifiée dans la race Lacaune est nommée FecX^L et la protéine produite BMP15^{C53Y}.

Les brebis porteuses de la mutation à l'état hétérozygote présentent un taux d'ovulation significativement supérieur à la normale, alors que les homozygotes demeurent stériles y compris après stimulation ovarienne.

Le but de ce travail est l'évaluation d'une méthode PCR en temps réel, utilisant le principe de la HRM (High Resolution Melting), pour identifier les variants à partir de prélèvements sanguins.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. TRAITEMENT BIO-INFORMATIQUE

La séquence retenue est la séquence publiée sous le N° AF236079. Les amorces ont été dessinées grâce au logiciel LightCycler Probe Design Software 2.0 fourni par la société Roche. Les comparaisons de séquences ont été réalisées en utilisant le logiciel BLAST. Les amorces retenues sont compatibles avec une analyse HRM des amplicons obtenus.

Le fragment amplifié a une longueur de 161 pb, ce qui est suffisamment court pour une analyse HRM.

1.2. EXTRACTION

Les prélèvements analysés sont des échantillons de sang total prélevé sur tubes EDTA. Ces échantillons de sang total ont été prélevés sur des béliers dont le génotype BMP15 était déjà connu pour servir de références. Ils nous ont été aimablement fournis par la coopérative OVITEST.

L'ADN génomique est extrait à l'aide du kit Roche MagNa Pure LCDNA Isolation kit. L'extraction est automatisée et réalisée sur un appareil KingFischer de la société ThermoLife Science.

1.3. AMPLIFICATION

L'amplification est réalisée en utilisant le thermocycler temps réel LC480 (Roche). Les amorces ont été produites par la société Tib Mol Biol (Berlin).

Les analyses de PCR sont faites sous un volume final de 20 µl contenant 5 µl d'extrait d'ADN. Le mix utilisé est le mix Light Cycler 480 high résolution Melting Master (Roche Diagnostic) auquel est ajouté 1 µl d'amorces (4 µM), 2.4 µl de MgCl2 et 1.6 µl d'eau.

2. RESULTATS

2.1. ANALYSE DES RESULTATS

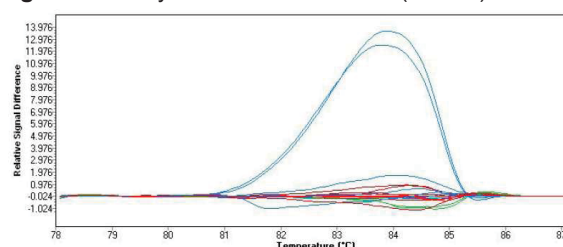
Pour chaque échantillon provenant d'un mâle, l'extrait d'ADN est constitué de 2.5 µl d'ADN de l'échantillon à analyser et de 2.5 µl d'ADN d'un individu non mutant connu.

Pour l'analyse des courbes HRM, des témoins connus sont placés en référence. Pour les animaux présentant une mutation, un pic sur la courbe HRM sera visible, l'analyse

différentielle des échantillons mutés doit être suffisante pour être validée.

Tous les échantillons ont été passés en triple exemplaire afin de vérifier la répétabilité de l'analyse, l'analyse des courbes HRM a montré pour chacun des échantillons une parfaite répétabilité. Aucun défaut de spécificité n'a été mis en évidence.

Figure 1 : analyse des courbes HRM (béliers)



2.2. RESULTATS TERRAINS

Plusieurs dizaines d'échantillons sanguins issus principalement de béliers de race Lacaune viande ont été analysés en utilisant cette technique. Un ancêtre commun connu est à l'origine de la dissémination de cette mutation qui est a priori présente dans la race avec une fréquence faible.

Au total 228 échantillons ont été analysés, la mutation C53Y du gène BMP15 a pu être mise en évidence sur seulement 2 animaux, ce qui vient confirmer la faible prévalence de cette mutation au sein de la Lacaune.

3. DISCUSSION

Des taux d'ovulations exceptionnellement élevés ne sont pas toujours souhaitables dans l'espèce ovine. Les effets cumulés de plusieurs types de mutations peuvent avoir des conséquences lourdes pour les cheptels. Il est donc indispensable de disposer d'outils adaptés pour optimiser le choix des futurs reproducteurs. Notre travail s'est bien évidemment orienté vers la race Lacaune en premier lieu parce qu'elle a été l'objet de plusieurs études dans le domaine de la prolificité, mais aussi puisqu'elle est très implantée dans le bassin Roquefort.

4. CONCLUSION

La place de la génomique dans les schémas de sélection devenant de plus en plus importante, il est nécessaire de disposer de méthodes utilisables en routine sur des gènes d'intérêt notamment pour le suivi de la prolificité.

La technique proposée présente l'avantage d'être d'une interprétation aisée pour un coût intéressant ; de plus, ce test peut être réalisé sur de grandes séries. L'analyse de la mutation est également réalisable sur les brebis où elle nécessite deux PCR, l'une avec un échantillon pur, la deuxième avec rajout de 2.5 µl d'ADN d'un individu non mutant connu permettant ainsi de différencier les hétérozygotes des homozygotes (résultats non présentés ici).

Les auteurs tiennent à remercier OVITEST pour les prélèvements (en particulier Mr Hallauer) et Mr Philippe Mulsant de l'INRA de Castanet Tolosan, pour son aide.

Bodin L., Di Pasquale E., Fabre S., Bontoux M., Monget P., Persani L., and Mulsant P., 2006. Endocrinol. 148 (1) : 393-400.