

Association of lameness incidence and FGF-2 polymorphism

L'étude du polymorphisme génétique du gène FGF-2 et son effet sur l'incidence des boiteries chez les vaches Holstein en Tunisie

M. A. FERCHICHI¹, B. JEMMALI², S. AMIRI¹, S. BEJAOUT¹, A. BEN GARA², B. REKIK²

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

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

*Corresponding author: med.amine.ferchichi@gmail.com

Abstract – This study analyzes the association of genetic polymorphism of FGF-2 gene locus with lameness in dairy cattle in Tunisia. DNA was extracted from 412 blood samples from Holstein cows (lame, lame healed and non-lame). Genotyping was performed by the PCR-RFLP and the Csp6I restriction enzyme was used for single nucleotide polymorphism identification. Electrophoresis profile of the digestion product reveals the presence of 171 // 171bp bands; 270 // 171 bp and 270 // 270 bp respectively for genotypes GG, GA and AA. Statistical analysis of genetic and environmental data by logistic regression showed that multiparous cows are more sensitive to lameness than primiparous. The incidence of lameness is high in autumn and winter. There are any association between this polymorphism and the incidence of lameness.

Keywords: Polymorphism, FGF-2, PCR-RFLP, lameness

Résumé – L'objectif de notre étude est d'étudier l'association de polymorphisme génétique du locus de gène FGF-2 avec la boiterie chez les bovins laitiers en Tunisie. L'ADN a été extrait à partir de 412 échantillons du sang des vaches Holstein (boiteuses, boiteuses guéries et non boiteuses). Le génotypage a été effectué par la technique PCR-RFLP et l'utilisation de l'enzyme de restriction Csp6I. Le profil d'électrophorèse du produit de digestion pour le gène FGF-2 révèle la présence des bandes 171 // 171pb ; 270// 171pb et 270 // 270 pb respectivement pour les génotypes GG, GA et AA. L'analyse statistique des données génétiques et environnementales par la régression logistique a montré que les vaches multipares sont plus sensibles aux boiteries que les vaches primipares. Et l'incidence des boiteries est élevée en automne et en hiver. L'étude du polymorphisme génétique du gène FGF-2/Csp6 n'a montré aucune association entre ce polymorphisme et l'incidence des boiteries. Par conséquent, son utilisation dans les schémas de sélection n'a aucun effet négatif sur ce trait de grand intérêt économique.

Mots clés : Polymorphisme, FGF-2, PCR-RFLP, boiterie

1. Introduction

Le pied est un organe très vulnérable vue sa structure anatomique (faible irrigation sanguine), sa position (exposé aux accidents et infections), sa fonction (locomotrice). Cette vulnérabilité a été accrue par le processus d'amélioration génétique qu'a connu le cheptel mondial, particulièrement les races bovines laitières, dont la race Holstein. Ainsi, la structure anatomique du pied et son degré d'exposition aux risques (structure trigonométrique du squelette) et leur éventuelle héritabilité ont incité certains chercheurs à dénicher dans les génomes des vaches laitières. En effet, nombreuses études ont mis en exergue une corrélation positive entre les caractéristiques anatomiques des pieds et des membres avec des facteurs de croissance, à nom anglo-saxon : « *fibroblastgrowthfactors* » et noté FGF.

La synthèse de ces FGF, une famille de sept polypeptides (Goulier et al. 1991), est sous l'effet d'un gène, appelé FGF-2, localisé sur le chromosome 17. Il a une longueur d'environ 59 kb comprenant 3 exons codant pour une protéine de 156 acides aminés (Khatkar et al., 2004 et Wang et al., 2008). Dix-sept SNP ont été détectés dans le gène FGF2 bovin dans les introns 1 et 2 et ont été proposés dans la base de données NCBI. Le FGF-2 a des effets pléiotropiques (multiples rôles) sur le fonctionnement des



cellules et sur des différents organes (glande mamelle) (Plath. 1998), la survie embryonnaire et ovaire) (Berisha et al., 2003), qui influence la formation des follicule ovarienne ou l'apparence de multiples traits phénotypiques (production laitière et ses traits) (Oikonomou et al., 2011). Wang et al. (2008) ont détecté un SNP (G / A) dans l'intron 1 à la position 11646 qui était associé à la production laitière et ses traits, au scores cellules somatiques et à la durée de vie productive. Le facteur de croissance des fibroblastes 2 (FGF2 ou basique) est principalement exprimé dans les cellules de la thèque bovine (Berisha et al., 2003) et synthétise dans l'endomètre utérin pendant le cycle œstral et la grossesse précoce. Il est à rappeler que les fibroblastes sont présents dans les nombreux tissus conjonctifs de l'organisme. On trouve ainsi des fibroblastes dans la peau, les tendons, le cartilage, etc. Elles sont en particulier chargées de synthétiser les autres cellules formant les tissus conjonctifs. Elles sécrètent aussi des substances luttant contre certains virus et bactéries. Cette action anti-infectieuse est assurée par la sécrétion de facteurs chimiotactiques (MCP, MIP) et d'interféron β (Lilu et al., 2011). Les effets de FGF-2 via les fibroblastes sont d'ordre anatomo-physiologique : (i) Elle stimule la croissance des cellules musculaires lisses, la cicatrisation des plaies (stimule l'hématopoïèse) et la réparation des tissus (Basilico et Moscatelli., 1992 et Schwartz et liaw., 1993). (ii) Elle joue un rôle important dans la différenciation et le fonctionnement du système nerveux... (MCAvoy et al. 1991) et le squelette (Riley et al. 1993 et Fallon et al 1994). Selon, Wilson et al. 1991, la myélopoïèse est renforcée par le FGF-2 dans les cultures de moelle osseuse à long terme. (iii) Elle peut stimuler directement la croissance et la différenciation des cellules souches ou progénitures granulocytaires (Gabanelli et al.1990), comme elle est un stimulateur de la mégacaryocytopoïèse (Bikfalvi et Han.,1994 et Bikfalvi et al. 1991). Le mécanisme d'action des FGF sur leurs cellules cibles passe par leur liaison à des récepteurs spécifiques situés à la surface des cellules. Ces récepteurs aux FGF (ou FGF-R) constituent un groupe de molécules capables de recevoir des signaux de l'extérieur et de les transmettre à l'intérieur de la cellule et induire de nombreux messages cellulaires secondaires. Ces récepteurs ont généralement une activité tyrosine kinase dans leur domaine intracellulaire.

L'objectif de cette étude est d'étudier le polymorphisme génétique du gène FGF-2 et son effet sur l'incidence des boiteries chez les vaches Holstein en Tunisie.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Echantillonnage et extraction d'ADN

Une prise de sang a été réalisée équitablement sur trois catégories de vaches Holstein (boiteuse, non boiteuse et boiteuse guéri). Elle a été faite sur 412 vaches laitières de la race Holstein présentes sur quatre ans (2013-2017) à la ferme Chargui, située au nord-est de la Tunisie (37°01'09.8"N 9°39'38.8"E). Un kit commercial (innuPREF Blood DNA mini kit) a été utilisé pour l'extraction de l'ADN génomique le protocole du kit d'extraction comporte 4 étapes de bases qui sont : (i) lyse des cellules rouges et des cellules blanches ; (ii) dégradation des protéines ; (iii) précipitation des protéines ; (iv) précipitation de l'ADN génomique.

2.2. Protocole de PCR-RFLP

L'amplification de la séquence cible a été fait par la technique la réaction polymérase en chaine (PCR) en utilisant un mélange réactionnel contenant des amorces spécifiques pour chaque gène étudié (Tableau 1 et 2). La PCR comporte un cycle de trois phases à différentes températures et différentes durées : (i) la première phase est une phase de dénaturation de la séquence cible à double brin à 95°C pendant 40s ; (ii) la deuxième phase est une phase d'hybridation de la séquence cible à simple brin à 50°C pendant 40s ; (iii) 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 Csp6I (Tableau 3) par la technique de détection des mutations connues, le polymorphisme de longueur des fragments de restriction.

Tableau 1. Les amorces de la séquence cible du gène FGF-2.

Gène	Amorces	Taille PCR
FGF-2	F : 5'-CATAGTTCTGTAGACTAGAAG-3' R : 5'-CCTCTAAAGAAGG ATTAAGTCAAATGGGGCTGGTA-3'	207pb

F : amorce sens ; R : anti-sens ; Khatib et al.,2008b et Oikonomou et al.2011.

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

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

Gène	Enzyme de restriction	T° de digestion	Références
FGF-2	Csp6I	37°C	Khatib et al. (2008b) Oikonomou et al. (2011)

Les produits PCR ont été digérés à l'aide des enzymes de restriction Csp6I pour le gène FGF-2 dans un mélange réactionnel qui contient 12µl du produit PCR, 0.3µl d'enzyme de restriction (Csp6I), 2.5 µl du tampon (Buffer), 0.2 BSA et 10 µl d'eau autoclavée. Le mélange réactionnel a été incubé à 37 °C pendant 12 heures. Les fragments ont été séparés sur le gel d'agarose de 2%, coloré avec du Gelstain et ont été visualisés sous lumière UV.

2.3. Analyse statistique

Une régression logistique binomiale (Agresti, 1990) a été utilisée pour étudier la relation entre les génotypes du gène FGF-2 et l'incidence de la boiterie (PROC LOGISTIC) dans SAS (1999). Le niveau de signification de 5% était la limite supérieure pour que le génotype soit considéré important pour expliquer l'incidence de la boiterie. Soit y une variable binomiale, le résultat est 1 si la vache est boiteuse ou bien boiteuse guéris, et elle est 0 si la vache n'a jamais boité. Pi est la probabilité de l'incidence de la boiterie.

$$\text{Log} \left(\frac{P_i}{1 - P_i} \right) = \sum_{n=1}^i (\beta_i x_i)$$

Avec :

Pi : la probabilité d'incidence de la boiterie

βi : le coefficient de régression de la variable xi.

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).

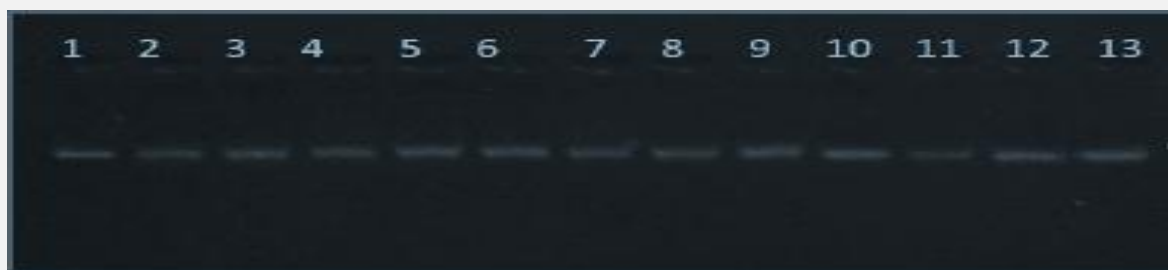


Figure 1. Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 1% des échantillons d'ADN génomique des individus analysés. 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12 et 13 vaches.

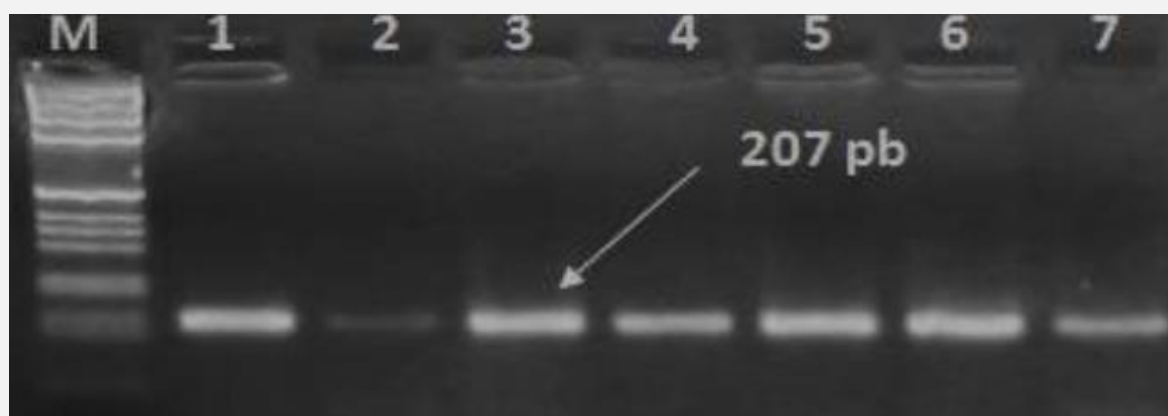


Figure 2. Migration des produits PCR du gène FGF-2, sur gel d'agarose 1.5 % coloré au *Gel Stain*. colonne 1-2-3-... : les individus analysés.

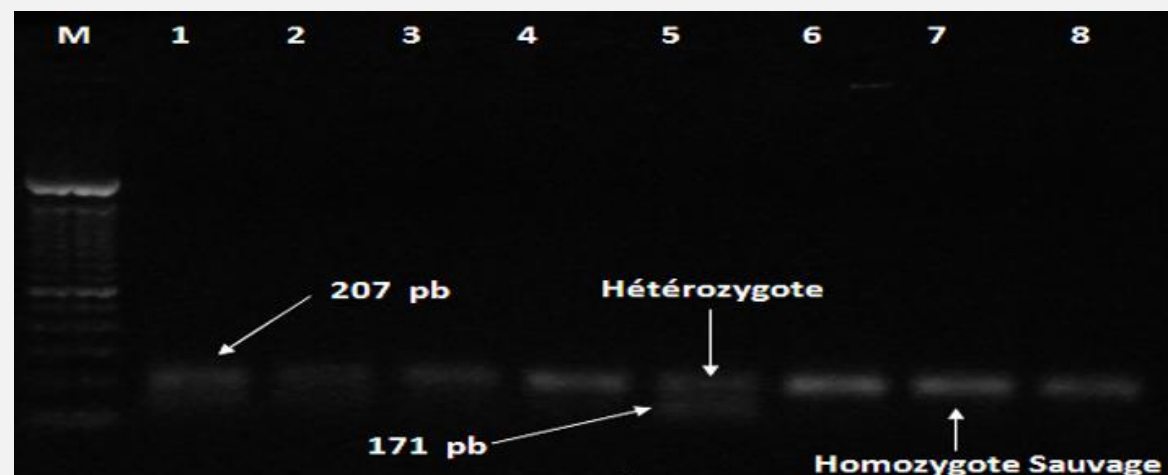


Figure 3. Le profil d'électrophorèse des produits de digestion des amplifias du gène FGF2. M : marqueur de taille (100 pb, *Biomatik*[®]) ; 1..8 : vaches analysées

3.2. Fréquences génotypiques et fréquences alléliques

Les produits amplifiés ont été digéré par l'enzyme de restriction *Csp6I*. Cette endonucléase a deux sites de coupure. La présence du site de restriction indique la présence de la mutation. La digestion des produits PCR a montré des bandes de 207 et 171 respectivement pour l'allèle G et l'allèle A. La migration sur gel d'agarose 2 % est représentée dans la figure 3. Les fréquences génotypiques et alléliques du gène FGF-2 est représentées dans le tableau 4.

Les fréquences génotypiques du gène FGF2 est de l'ordre de 0.29, 0.53 et 0.18 respectivement pour les génotypes (GG), (GA) et (AA). Et les fréquences alléliques sont de l'ordre de 0.56 et 0.44

respectivement pour l'allèle G et l'allèle A. ces fréquences s'accordent à ceux de Khatib et al. (2008b) et Wang et al (2008). Öner et al. (2017) ont rapporté que les fréquences alléliques chez les vaches Holstein en Turquie sont de l'ordre de 0.34 et 0.66 respectivement pour l'allèle A et l'allèle G.

Tableau 4. Les fréquences génotypiques et les fréquences alléliques du gène FGF-2

Locus	Polymorphisme	Allèle		Génotypique(%)			Allélique (%)	
		G	A	GG	GA	AA	G	A
FGF-2	SNP11646	G	A	0.29	0.53	0.18	0.56	0.44
		G	A					

3.3. Effet du polymorphisme génétique sur l'incidence des boiteries

La parité, la saison de vêlage, l'âge au vêlage et l'année de vêlage semblent affecter l'incidence des boiteries chez les vaches Holstein en Tunisie ($P < 0.01$). Au contraire au polymorphisme génétique du gène FGF-2/Csp6I qui ne semble pas affecter cette incidence (Tableau 5).

Tableau 5. Les estimés du coefficient de régression et du cote par le maximum de Likelihood.

Variable	coefficient	Cote	Intervalle Confiance 95 %		P-value
Parité					
1	<i>Référent</i>	-	-	-	-
2	0.24	1.28	1.06	1.53	0.01
3	0.64	1.90	1.41	2.57	0.01
Saison					
Automne	<i>Référent</i>	-	-	-	-
Hiver	0.2465	1.27	1.08	1.50	0.01
Printemps	-0.3398	0.71	0.71	0.58	0.01
Eté	-0.0770	0.92	0.78	1.08	0.34
Génotypes					
AA	<i>Référent</i>	-	-	-	-
GA	-0.1092	0.89	0.75	1.06	0.22
GG	-0.0929	0.91	0.75	1.10	0.33
Age au vêlage	0.000244	1.00	1.00	1.00	0.01
Année de vêlage	0.00036	1.00	1.00	1.00	0.01

La probabilité d'incidence des boiteries est de l'ordre de 28% et 90% respectivement pour la deuxième et la troisième parité. Cette probabilité augmente avec l'augmentation de la parité. L'incidence des boiteries est plus importante chez les multipares que chez les primipares. Ceci s'explique par la dégradation de l'état des onglons des vaches (Thierry, 2013), par l'augmentation de la production laitières et ses traits et l'acidose suite à un déséquilibre de la ration pour couvrir les besoins des vaches (Gohier et Fournier 2000 et Whitaker et al. 2002).

La chance d'avoir des vaches boiteuses en hiver est en automne est plus élevée par rapport à la saison du printemps et d'été. La probabilité d'incidence des boiteries est supérieure de 27% par rapport à la saison d'automne. Ceci est dû à l'humidité et stagnation d'eau dans les aires d'exercices et de couchages ce qui favorise le développement des bactéries et sa propagation. Selon Thierry (2013), l'excès d'humidité et le mauvais entretien des onglons favorisent cette pathologie.

Le polymorphisme génétique du gène FGF-2/Csp6I ne semble pas affecter l'incidence des boiteries. Ce résultat s'accorde avec Oikonomou et al. 2011, qui ont étudié l'effet du polymorphisme FGF-2 et sa relation avec la boiterie. Oikonomou et al. 2011 ont indiqué que ce polymorphisme ne semble pas affecter la boiterie.

4. Conclusion

L'étude du polymorphisme génétique du gène FGF-2/Csp6 n'a montré aucune association entre ce polymorphisme et l'incidence des boiteries. Par conséquent, son utilisation dans les schémas de sélection n'a aucun effet négatif sur ce trait de grand intérêt économique.

Remerciements

Les auteurs remercient l'office d'élevage et du pâturage (OEP) et la société de mise en valeur et du développement agricole (Chergui).

5. Références

- Agresti A (1990)** Categorical Data Analysis. Wiley, New York.
- Basilico C, Moscatelli D (1992)** The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv Cancer Res* **59**: 115–165.
- Berisha B, Sinowatz F, Schams D (2004)** Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family members during the final growth of bovine ovarian follicles. *MolReprod Dev* **67**:162-171.
- Bikfalvi A, Han Z C (1994)** Angiogenic factors are hermatopoeitic growth factors and vice versa. *Leukemia*, **8**, 523-529.
- Bikfalvi A, Sauzeau C, Moukadiri H (1991b)** Interaction of vasculotropin, vascular endothelial growth factor with human umbilical vein endothelial cell: binding, internalisation, degradation and biological effects. *Journal of Cell Physiology* **149**: 50-59.
- Fallon J F, López A, Ros M A, Savage M P, Olwin B B, Simandl B K (1994)** FGF-2: apical ectodermal ridge growth signal for chick limb development. *264(5155)* :104-7.
- Gabblianelli M, Sargiacomo M, Pelosi E, Testa U, Isacchi G, Peschle C (1990)** Pure Human hermatopoietic progenitors : permissive action of basic fibroblast growth factor. *science*, **249**, 1561-1564.
- Gamelin F X, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009)** Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J ApplPhysiol* **105**:731-738.
- Gohier Y, Fournier A (2000)** La biotine, une vitamine essentielle pour la santé des onglons. *Bovinslaitiers, fiches techniques*.
- Khatib H, Maltecca C, Monson R L, Schutzkus V, Wang X, Rutledge J J (2008b)**. The fibroblast growth factor 2 gene is associated with embryonic mortality in cattle. *Journal of Animal Science* **86**, 2063–2067.
- Khatkar M S, Thomson P C, Tammen I, Raadsma H W (2004)** Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis. *Genetic Selection and Evolution* **36**, 163–190.
- Liu J, Xu X, Feng X, Zhang B, Wang J (2011)** Adenovirus-mediated delivery of bFGF small interfering RNA reduces STAT3 phosphorylation and induces the depolarization of mitochondria and apoptosis in glioma cells U251. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **30**:80.
- McAvoy J W, Chamberlain C G, De Iongh R U, Richardson, N A, Lovicu, F J (1991)** The role of fibroblast growth factor in eye lens development. *Ann. New York AcademySci.* **638**, 256-74.
- Oikonomou G, Michailidis G, Kougioumtzis A , Avdi M , Banos G (2011)** Effect of polymorphisms at the STAT5A and FGF2 gene loci on reproduction, milk yield and lameness of Holstein cows. *Research in Veterinary Science* **91**:235–239.
- Oner Y, Yilmaz O, Okut H, Ata N, Yilmazbaş-Mecitoğlu G, Keskin A (2017)** Associations between *GH, PRL, STAT5A, OPN, PIT-1, LEP* and *FGF2* polymorphisms and fertility in Holstein-Friesian heifers. *KafkasUnivVetFakDerg.*, **23** (4): 527-534.
- Plath A, Einspanier R, Gabler C, Peters F, Sinowatz F, Gospodarowicz D, Schams D (1998)** Expression and localization of members of the fibroblast growth factor family in the bovine mammary gland. *J Dairy Sci* **81**:2604-2613.
- Riley R T, An N H, Showker J L, Yoo H S, Norred W P, Chamberlain W J, Wang E, Merrill A H J r, Motelin G, Beasley V R, Haschek W M (1993)** Alteration of tissue and serum sphinganine to sphingosine ratio: an early biomarker of exposure to fumonisin-containing feeds in pigs. *Toxic.uppl. Pharmac.* **118**, 105-I 12.
- SAS, SAS/STAT User’s Guide (1999)** Release 8.E. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Schwartz S M, Liaw L (1993)** Growth control and morphogenesis in the development and pathology of arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol., (Suppl.1)*, **21**:31–49.
- Thierry F (2013)** Les boiteries des bovins. *Mémos vétérinaires. Revenu Agricole Conduite & gestion du troupeau.*
- Wang X, Maltecca C, Tal-Stein R, Lipkin E, Khatib H (2008)** Association of bovine fibroblast growth factor 2 (FGF2) gene with milk fat and productive life: an example of the ability of the candidate pathway strategy to identify quantitative trait genes. *Journal of Dairy Science* **91**, 2475–2480.
- Whitaker A D, Kelly J M, Smith S (2002)** Disposal and disease rates in 340 British dairyherds. *VetRec* **146**: 363-367.
- Wilson E I, Rifkin D B, Kelly F, Hannocks M J, Gabrilove J L (1991)** Basic fibroblast growth factor stimulates myelopoiesis in long-term human bone marrow cultures. *Blood.* **77**(5) : 954-60.