



**HAL**  
open science

# Étude de la physiopathologie d'une anomalie immunitaire d'origine génétique dans la race Prim'Holstein : le BLIRD

Adèle Clément

► **To cite this version:**

Adèle Clément. Étude de la physiopathologie d'une anomalie immunitaire d'origine génétique dans la race Prim'Holstein : le BLIRD. Médecine vétérinaire et santé animale. 2023. dumas-04470026

**HAL Id: dumas-04470026**

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04470026v1>

Submitted on 21 Feb 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ANNEE 2023 THESE : 2023 – TOU 3 – 4105

---

# ETUDE DE LA PHYSIOPATHOLOGIE D'UNE ANOMALIE IMMUNITAIRE D'ORIGINE GENETIQUE DANS LA RACE PRIM'HOLSTEIN : LE BLIRD

---

THESE D'EXERCICE

pour obtenir le titre de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**CLÉMENT Adèle, Inès,  
Blanche**

**Directeur de thèse : M. Gilles FOUCRAS**

---

**JURY**

PRESIDENTE :  
**Mme Nicole HAGEN-PICARD**

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

ASSESEURS :  
**M. Gilles FOUCRAS**  
**M. Alain DUCOS**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE  
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

A la Présidente du jury, Mme la Professeure Nicole Hagen,  
Professeur de Pathologie de la reproduction de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

*Reproductions des ruminants*

Qui me fait l'honneur de présider le jury de cette thèse et de juger ce travail,

Hommages respectueux

A mon maître de thèse, Mr. le Professeur Gilles Foucras,

Maitre de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Professeur de médecine des animaux de production et d'immunologie de l'Ecole National, praticien hospitalier

*Pathologie des ruminants*

Pour avoir encadré et dirigé ce travail avec soin et exigence, pour l'avoir intégré à un projet de recherche de plus grande ampleur, pour sa patience, son enthousiasme et son soutien

Très sincères remerciements

A l'assesseur du jury, Mr. le Professeur Alain Ducos,

Professeur en génétique animale à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Production animale - Génétique*

Pour avoir accepté de corriger et juger ce travail, pour avoir permis la rencontre avec l'unité de recherche de l'INRAe de Jouy-en-Josas pour la réalisation du stage aux prémices de cette thèse

Sincères remerciements

## Table des matières

Table des abréviations.....	8
I) Contexte général de la sélection génétique des bovins laitiers et nouvelles méthodes d'identification des anomalies génétiques .....	9
A) Sélection génétique dans la race Prim'Holstein : .....	9
1- Origine, histoire et dynamique de la race Prim'Holstein dans le cheptel Français.....	9
2- Standard actuel de la race Prim'Holstein .....	11
3- Effets observés et conséquences négatives de la sélection.....	13
4- Les anomalies génétiques bovines .....	15
a. Qu'est-ce qu'une anomalie génétique ?.....	15
b. Déterminisme autosomal récessif .....	17
c. Déterminisme autosomal dominant .....	18
B) L'Observatoire National des Anomalies Bovines : description, fonctionnement et intérêt .....	20
C) Détection des anomalies génétiques par l'approche classique : du phénotype à la mutation causale.....	21
D) La génétique inverse, une méthode novatrice dans la recherche d'anomalies .....	24
1-Recherche des régions du génome avec un déficit en homozygotes .....	25
2- Les haplotypes candidats porteurs de variants délétères établis par l'ONAB.....	26
3-Identification du variant sur le gène ITGB7 au sein de l'haplotype candidat .....	28
4- Intérêt de l'étude de la longévité pour la recherche d'anomalies génétiques.....	29
E) Conduite à tenir après l'identification d'une anomalie génétique affectant la longévité .	30
1- A l'échelle de la filière, choix de la stratégie de gestion de l'anomalie .....	30
2-A l'échelle des acteurs de la filière : outils de gestion à disposition.....	33
II)Etude bibliographique sur le gène <i>Itgb7</i> et possibles conséquences physiopathologiques en lien avec la mutation .....	34
A) Le gène <i>Itgb7</i> .....	34
1- Structure moléculaire, assemblage.....	35
2- Les intégrines : expression et interactions avec les ligands .....	36
3- Conséquences attendues de la mutation en termes fonctionnels .....	39
B) Immunité digestive.....	40
1- Effecteurs cellulaires et organisation du système lymphoïde.....	40
2- Conséquences fonctionnelles de l'absence ou de la mutation d' <i>Itgb7</i> sur l'immunité digestive .....	43
3- Conséquences physiopathologiques.....	45
III)Caractérisation clinique et biologique des conséquences de la mutation ponctuelle d'ITGB7 dans l'espèce bovine .....	47
A) Cadre et objectif de l'étude .....	47

B) Matériel et méthodes.....	48
1-Recherche d'animaux candidats à l'étude de la mutation .....	48
a-Recrutement d'animaux vivants homozygotes pour la mutation ITGB7 à l'aide des données de génotypage .....	48
b- Recrutement d'animaux hétérozygotes et témoins .....	49
c- Répartition des animaux faisant partie de l'étude.....	49
d-Prévalence estimée et répartition des animaux porteurs de la mutation dans le cheptel français.....	50
e. Etude par généalogie de l'apparition historique de la mutation.....	51
2-Collecte et enregistrement des données.....	52
a-Matériel utilisé lors des visites.....	52
b- Examen clinique .....	53
c-Photographie.....	54
d-Prélèvements biologiques.....	54
3-Examens de laboratoire .....	54
a-Hémogramme .....	54
b-Cytométrie en flux .....	55
C)Résultats.....	57
1- Description clinique.....	57
a-Animaux candidats recrutés dans l'enquête terrain.....	57
i) Description phénotypique, aspect macroscopique.....	58
ii) Historique sanitaire.....	61
iii) Poids des animaux en fonction de l'âge et selon le statut à la mutation.....	61
a- Suivi clinique de trois animaux hospitalisés à l'ENVT.....	62
b- Suivi zootechnique des animaux du Pin (UE INRAE).....	63
2- Données paracliniques.....	64
a-Hémogramme .....	64
i- Comparaison des différentes populations leucocytaires entre les individus porteurs et non porteurs .....	64
ii- Concentration en leucocytes en fonction de l'âge selon le statut à la mutation	66
b-Cytométrie en flux .....	67
V) Discussion générale.....	70

## Table des tableaux

Tableau 1 : Présentation des conséquences des mutations de l'ADN sur les chaînes protéiques transcrites .....	16
Tableau 2 : Principaux haplotypes rendus publics associés à des déficits d'individus homozygotes en Suisse .....	27
Tableau 3 : Principaux haplotypes rendus publics associés à des déficits d'individus homozygotes en France.....	27
Tableau 4 : Estimation du coût c en fonction de la fréquence de dix anomalies génétiques dans la population Holstein américaine.....	31
Tableau 5 : Liste des anomalies génétiques réglementées pour l'accès des taureaux Holstein à la monte publique mis à jour au 04/05/2012.....	33
Tableau 6 : Récapitulatif des entrées et sortie des animaux hospitalisés à l'ENVT .....	63

## Table des illustrations

Figure 1 : Vache Frisonne vers 1950 .....	10
Figure 2 : Résultats 2021 du programme VARUME (IDELE) en race Prim'Holstein : mise en valeur du déséquilibre du ratio sexuel dans la race.....	11
Figure 3 : Objectifs 2021 de sélection de la race Prim'Holstein.....	12
Figure 4 : Evolution au cours des soixante dernières années du coefficient de consanguinité de six races laitières de l'espèce bovine dans les six pays principaux producteurs .....	14
Figure 5 : Mécanisme de transmission d'une anomalie génétique de déterminisme autosomique récessif ____	17
Figure 6 : Photographies de veaux Montbéliard à gauche et d'un veau Montbéliard « Milka » à droite ____	18
Figure 7 : Mécanisme de transmission d'une anomalie génétique de déterminisme autosomique dominant ____	19
Figure 8 Photographie d'un veau Holstein atteint d'achondrogénésie ____	20
Figure 9 : coupe longitudinale d'un membre du sujet atteint ____	20
Figure 10 : Actions et objectifs de l'ONAB.....	21
Figure 11 : Illustration simplifiée de deux SNP .....	23
Figure 12 : Illustration du principe de déséquilibre de liaison du variant délétère (étoile jaune) avec l'haplotype (en rouge).....	25
Figure 13 : Courbes de survie en relation avec la mutation sur le gène ITGB7 .....	30
Figure 14 : Mention des anomalies génétiques sur les feuilles de résultats de génotypage pour la race Prim Holstein .....	34
Figure 15 : Localisation du gène Itgb7 sur le chromosome 5 dans l'espèce bovine (Bos taurus) .....	34
Figure 16 : Domaines conservés de la protéine A7YWN9 et leur localisation dans la structure tridimensionnelle (représentation schématique par assistance informatique) .....	35
Figure 17 : La famille des intégrines.....	36
Figure 18 : Illustration schématique des différentes conformations possibles des intégrines .....	38
Figure 19 : Illustration schématique de l'activation des intégrines par les signaux « inside-out » et « outside-in » .....	38
Figure 20 : structure tridimensionnelle prédite par assistance informatique du complexe LPAM-1 (dimère $\alpha 4\beta 7$ ) et de son ligand MAdCAM-1 .....	39
Figure 21 : schéma simplifié résumant le fonctionnement de l'immunité locale digestive au sein du GALT ____	41
Figure 22 : structure quaternaire du complexe $\alpha 4\beta 7$ (LPAM-1) et son ligand.....	44
Figure 23 : coupes histologiques et immunohistochimiques de jéjunum de souris ITGB7+ à gauche et ITGB7 – à droite .....	46
Figure 24 : Répartition géographique des élevages recrutés dans l'étude, zoom sur les cohortes Sud-Normandie et Sud-Ouest..... <b>Erreur ! Signet non défini.</b>	
Figure 25 : Cartographie de l'anomalie ITGB7 dans la race Prim'Holstein fin octobre 2022 .....	50
Figure 26 : Schéma simplifié retraçant les événements génétiques liés à la mutation sur le gène ITGB7 dans l'espèce bovine.....	52
Figure 27 : Positionnement du ruban barymétrique pour l'évaluation du poids d'un bovin.....	53
Figure 28 : Schéma simplifié du fonctionnement d'un cytométrie en flux avec des fluorochromes spécifiques des lymphocytes TCD4 et TCD8 .....	55

<i>Figure 29 : Répartition géographique des élevages recrutés dans l'étude, zoom sur les cohortes Sud-Normandie et Sud-Ouest</i>	58
<i>Figure 30 : Exemples les plus pertinents parmi les photographies réalisées</i>	60
<i>Figure 31: Poids des individus de l'enquête terrain en fonction de l'âge selon leur statut à la mutation</i>	62
<i>Figure 32 : Etude rétrospective des courbes de poids sur les deux premières années de vie de 655 animaux ayant logés à la ferme du Pin-au-haras</i>	63
<i>Figure 33 : Comparaison des concentrations leucocytaire sanguine en fonction du statut à la mutation</i>	65
<i>Figure 34 : Comparaison des concentrations lymphocytaires sanguine en fonction du statut à la mutation</i>	65
<i>Figure 35 : Comparaison des concentrations leucocytaires sanguines en fonction du statut à la mutation chez sept individus de la cohorte 2021</i>	66
<i>Figure 36 : Concentration leucocytaire sanguine en fonction de l'âge de l'individu selon le statut à la mutation</i>	67
<i>Figure 37 : Cytométrie en flux pour le marqueur « lymphocyte T-CD4 mémoire » chez les individus homozygotes mutés</i>	68
<i>Figure 38 : Résultats des analyses en cytométrie de flux avec des marqueurs spécifiques de <math>\alpha 4</math> et <math>\beta 7</math> dans le sang et dans la lamina propria</i>	69

Mots clés : BOVIN, ANOMALIE GENETIQUE, ITGB7, PRIM HOLSTEIN, IMMUNITE MUCOSALE, GENOTYPAGE, GENETIQUE INVERSE, INTEGRINE



**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation  
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

**Liste des directeurs/assesseurs de thèse de doctorat vétérinaire**

**Directeur : Professeur Pierre SANS**

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie, thérapeutique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et industrie des aliments d'origine animale*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, statistiques, modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie pathologique*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la reproduction, endocrinologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie médicale animale et comparée*

**PROFESSEURS 1<sup>ère</sup> CLASSE**

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, anatomie pathologique*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et thérapeutique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation animale*

**PROFESSEURS 2<sup>ème</sup> CLASSE**

- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des équidés et des carnivores*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, imagerie médicale*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et infectiologie*

## MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la reproduction*
- Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et industrie des denrées alimentaires d'origine animale*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et mathématiques*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

## MAITRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BRET Lydie**, *Physique et chimie biologiques et médicales*
- Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie, imagerie médicale*
- M. **COMBARROS Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie, bactériologie, pathologie infectieuse*
- Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- M. **FUSADE-BOYER Maxime**, *Microbiologie et infectiologie*
- M. **GAIDE Nicolas**, *Anatomie pathologique*
- Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
- Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie, analgésie*
- M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des équidés*
- Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
- M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire, maladies animales réglementées*
- Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

## INGENIEURS DE RECHERCHE

- M. **AUMANN Marcel**, *Urgences, soins intensifs*
- M. **AUVRAY Frédéric**, *Santé digestive, pathogénie et commensalisme des entérobactéries*
- M. **CASSARD Hervé**, *Pathologie des ruminants*
- M. **CROVILLE Guillaume**, *Virologie et génomique cliniques*
- Mme **DIDIER Caroline**, *Anesthésie, analgésie*
- M. **DELPONT Mattias**, *Clinique Aviaire*
- Mme **DUPOUY GUIRAUTE Véronique**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- Mme **GAILLARD Elodie**, *Urgences, soins intensifs*
- Mme **GEFFRE Anne**, *Biologie médicale animale et comparée*
- Mme **GRISEZ Christelle**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **JEUNESSE Elisabeth**, *Bonnes pratiques de laboratoire*
- Mme **LAYSSOL-LAMOUR Catherine**, *Imagerie Médicale*
- Mme **POUJADE Agnès**, *Anatomie pathologique Vétérinaire*
- Mme **PRESSANTI Charline**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **RAMON PORTUGAL Felipe**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- M. **REYNOLDS Brice**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **ROUCH BUCK Pétra**, *Médecine préventive*
- Mme **SAADA Chloé**, *Gestion intégrée de la santé des ruminants*

## Table des abréviations

AA	Acides Aminés
Ac	Anticorps
ADMIDAS	ADjacent au site d'adhésion dépendant d'ions métalliques
ADN	Acide Désoxyribonucléique
Anses	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
BALT	Bronchus Associated Lymphoid Tissue
BLAD	Bovine Leucocytes Adhesion Deficiency
BLIRD	Bovine Lymphocytes Retention Defect
cel	Cellule
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
DAB	Document d'Accompagnement du Bovin
DC	Cellule Dendritique
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
EGF	Epidermal Growth Factor
ENVT	Ecole Nationale Vétérinaire Toulousaine
FFPN	Française Frisonne Pie Noire
FNGDS	Fédération Nationale des Groupements de Défense Sanitaire
GALT	Gut Associated Lymphoid Tissue
HEV	High Endotelia Veinules (veinules à endothélium épais)
hmz	homozygote
htz	hétérozygote
IDELE	Institut de l'élevage
IEL	Intra-Epithelial Lymphocytes
IgA	immunoglobuline A
IgG1	immunoglobuline G1
INRAe	Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement
IVV	intervalle vêlage-vêlage
LPL	Lamina Propria Lymphocytes
LTc	Lymphocytes T cytotoxiques
LTCD4	Lymphocyte T CD4
LTCD8	Lymphocyte T CD8
MAdCAM-1	Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1
MALT	Mucosal Associated Lymphoid Tissue
mB	mégabases
mHt	MicroHématocrite
MIDAS	site d'adhésion dépendant d'ions métalliques
NALT	Nasal Associated Lymphoid Tissue
NEC	Note d'Etat Corporel
OLS	Organe lymphoïde secondaire
ONAB	Observatoire National des Anomalies Bovines
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PP	Plaque de Peyer
QTL	Quantitative Trait Loci
SDL	Specificity Determining Loop
SNGTV	Société Nationale des Groupements Techniques Vétérinaires
SNP	Single Nucleotid Polymorphism
svg	sauvage
SyMBS	synergeistic metal ion binding site
TCR	T-cell Receptor
Upra	Union pour la sélection et la promotion de la race
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
WBC	White Blood Cell

## I) Contexte général de la sélection génétique des bovins laitiers et nouvelles méthodes d'identification des anomalies génétiques

### A) Sélection génétique dans la race Prim'Holstein :

#### 1- Origine, histoire et dynamique de la race Prim'Holstein dans le cheptel Français

La Prim Holstein est la première race bovine laitière dans le monde aujourd'hui ("La race Holstein – Holstein Switzerland," 2018). En France, elle représente à elle seule 90 % du cheptel laitier. Son origine remonte aux Pays-Bas au XVIIIème siècle, où une race locale mixte avait été sélectionnée pour sa production de lait et sa bonne aptitude à l'engraissement. Elle était présente dans l'ancienne province de la Frise occidentale d'où son premier nom : la Frisonne. Elle est reconnaissable à sa grande taille malgré un squelette fin, et ses cornes courtes recourbées ("Historique de la Prim Holstein," Prim'Holstein France 2023). Les animaux arboraient alors la robe rouge jusqu'à l'importation de veaux de couleur noire en provenance du Danemark en 1713. Au vu du caractère dominant de ce gène, c'est par la suite le phénotype le plus répandu même si les deux robes coexistent encore aujourd'hui. La race Hollandaise (Dutch cows) sera exportée aux Etats unis à partir de 1857 où elle sera renommée Holstein bien que sans rapport établi avec la région Holstein du nord de l'Allemagne. Les Américains sélectionnent alors plus spécifiquement les vaches hautes productrices laitières avant de les exporter à nouveau vers l'Europe cette fois-ci sous le nom de Hollandaise. Près de 8000 animaux traversent alors l'Atlantique et ces nouveaux individus américains prédominent sur les races pie noire locales (notamment la pie noire bretonne). Le succès de la race en Europe pousse des éleveurs du nord de la France à créer « le Livre généalogique de la race Hollandaise » en 1922("Historique de la Prim Holstein," Prim'Holstein France 2023). Ce livre permet d'établir les critères du standard de la race (taille, robe, morphologie, etc..) en enregistrant comme y appartenant, des animaux modèles. Les descendants issus des accouplements de ces individus ont alors une origine reconnue et protégée par ce recueil.

Des animaux des lignées américaine et européenne qui ont des morphologies différentes cohabitent alors en France. La lignée européenne comprend des individus orientés vers un type mixte d'une certaine rusticité alors que les individus américains sont plus grands avec un type laitier plus marqué. Avec l'objectif d'amélioration de la race, la sélection s'appuie de plus en plus sur des données chiffrées universelles notamment grâce à la mise en place du contrôle laitier beurrier en 1919 (Vissac 2002). Celui-ci permet l'enregistrement systématique de la production individuelle du volume de lait. Au lendemain de la première guerre mondiale, des nouvelles technologies comme la généralisation de la pasteurisation et l'agrandissement du réseau de chemins de fer permettent de répondre à l'augmentation de la demande en produits lactés. Face à cette demande croissante, les éleveurs cherchent à obtenir des vaches de race hollandaise avec une production de lait plus élevée ce qui conduit à

l'abandon progressif de la lignée européenne face aux animaux d'origine américaine plus compétitifs.

Une autre innovation va imposer définitivement la lignée américaine : **l'insémination artificielle**. A partir de 1936 (R. H. Foote 2002) (The history of artificial insemination : Selected notes and notables), les meilleurs taureaux américains deviennent alors accessibles à moindre coût et diffusables à grande échelle. Au début des années 1950, les ménages français de la classe moyenne voient leur pouvoir d'achat augmenter et de nombreuses naissances accentuent la demande sur les produits laitiers, c'est la période des trente glorieuses. **La sélection pour des vaches toujours plus productrices dans des troupeaux toujours plus nombreux et au rendement de plus en plus efficace, apparait alors comme une solution.** En 1952, la Hollandaise est rebaptisée FFPN « Française Frisonne pie Noire » et atteint l'effectif de 1 500 000 vaches.

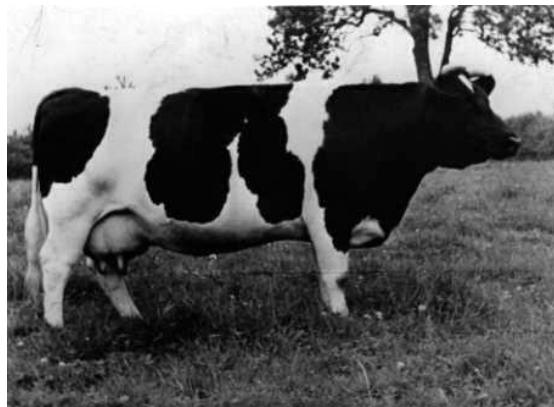


Figure 1 : Vache Frisonne vers 1950

(*"Prim'Holstein France | Association française des éleveurs de la race Prim'Holstein," consulté en 2022*)

Dans ce contexte économique très favorable, les médecins, les médias et l'industrie agro-alimentaire encouragent la consommation de produits lactés. Dans cette dynamique, on importe massivement les échantillons de semence provenant de taureaux nord-américains, sous la forme de paillettes, qui sont, selon la définition de l'Anses : « des conditionnements pour échantillons biologiques de petit volume permettant de conserver des petites doses de sperme congelé ». On parle alors de la deuxième vague de « holsteinisation » qui a lieu au cours des années 1960-70. La FFPN est absorbée progressivement par les lignées canadiennes et américaines et devient **en 1972 la première race française avec six millions d'individus** (Labatut and Tesnière, 2020). La race devient de plus en plus spécialisée et est désormais sélectionnée sur le gabarit et la qualité de sa mamelle. En 1975, la FFPN est renommée par l'Union pour la sélection et la promotion de la race (UPRA) et obtient son nom actuel : « Prim'Holstein » (Labatut and Tesnière, 2020). C'est l'âge d'or des taureaux pionniers de la race comme Round Oak Rag Apple Elevation, S-W-D Valiant, Carlin-M Ivanhoe Bell, Hanoverhill Starbuck et To-Mar Blackstar. L'insémination

artificielle permet alors la diffusion de leur génome au sein des cheptels français. Les qualités de ces taureaux sont évaluées dorénavant par des index qui sont une fonction régalienne de calcul des estimations de la valeur génétique (Labatut and Tesnière, 2020). Ces index sont définis selon des objectifs de sélection de la race fixés par l'Inra et l'Institut de l'élevage. ("Prim'Holstein France | Association française des éleveurs de la race Prim'Holstein," 2023)

Ces pratiques conduisent à l'utilisation à outrance des paillettes des meilleurs taureaux. Selon l'Institut de l'Elevage (IDELE), **sept taureaux ont contribué à 50 % des gènes totaux présents aujourd'hui dans le génome des animaux de race Prim' Holstein** sur la période 2017-2020. (Résultats 2021 du programme VARUME (IDELE)). Malgré une prise de conscience de cette problématique, la race Prim'Holstein reste la plus touchée par ce phénomène et la tendance n'est pas en train de s'inverser.

Critères issus de la probabilité d'origine des gènes		Période de naissance des femelles 2017 -2020	
Femelles	Période	Femelles	Mâles d'IA*
	2017 -2020		
Nombre de fondateurs	792 371	Nb d'animaux (au moins un parent connu)	3 270 708
Nombre de fondateurs efficaces (Fe)	82	Nb pères différents	18 870
Nombre d'ancêtres efficaces (Ae)	19	Nb max de descendants par père	34 390
Ratio Ae/Fe	23,2%	Nb grands-pères paternels différents	3 231
Contribution marginale de l'ancêtre principal	12,5%	Nb max de descendants par GPP	88 851
Nombre d'ancêtres expliquant 50% des genes	7	Nb mères différentes	2 423 544
		Nb max de descendants par mère	37
		Nb grands-pères maternels différents	30 758
		Nb max de descendants par GPM	69 454
		Nb d'animaux avec deux parents connus	2 938 424
		* père des femelles	
		Rapport 2 parents connus/total des femelles	90%

Figure 2 : Résultats 2021 du programme VARUME (IDELE) en race Prim'Holstein : mise en valeur du déséquilibre du ratio sexuel dans la race

("Bilan de variabilité génétique à partir des données de généalogies-Races bovines laitières IDELE," 2021)

Malgré tout, l'offre génétique étant de plus en plus diversifiée, les taureaux stars se voient aujourd'hui concurrencés par les nouvelles générations. En effet, dorénavant le marché est segmenté en « profils » de taureaux (Labatut and Tesnière, 2020) en fonction de caractères améliorateurs prédominants relatifs à la santé », la reproduction, la facilité de vêlage », la rusticité », la qualité du lait, sans oublier la production laitière, qui n'est plus la priorité absolue.

## 2- Standard actuel de la race Prim'Holstein

Pour appartenir à la race Prim'Holstein, l'individu doit être issu de deux parents appartenant tous les deux à la race : c'est le principe de filiation. ("Bilan de variabilité génétique à partir des données de généalogies Races bovines laitières" IDELE 2021). Les animaux présentent des caractéristiques physiques communes : une **grande taille** (moyenne de 145 cm au sacrum) avec un poids moyen femelle adulte de 600-700 kg ; une robe **pie noire** parfois pie rouge ; une **mamelle largement développée**. Grâce à une vitesse de croissance élevée, les animaux atteignent ces dimensions en

24-36 mois ce qui permet, dans de bonnes conditions d'élevage, aux génisses de vêler vers 2 ans. ("Prim'Holstein France | Association française des éleveurs de la race Prim'Holstein" 2023) On parle alors de **race précoce**. Sa **morphologie est adaptée à la fonction de production laitière** : les mamelles sont mobilisables facilement pour une traite mécanique. Les Prim' Holstein sont célèbres aussi pour leur **facilité de parturition** permise par un bassin large, allongé et légèrement incliné.



Figure 3 : Objectifs 2021 de sélection de la race Prim'Holstein

("Prim'Holstein France | Association française des éleveurs de la race Prim'Holstein" 2023)





### 3- Effets observés et conséquences négatives de la sélection

Depuis la domestication, les Hommes font de la sélection génétique de façon involontaire. En effet, en choisissant de faire reproduire entre eux les mâles et les femelles les plus dociles, les plus beaux, les plus fertiles, ceux dont la production de lait est la plus élevée, les plus gros, etc... ; les générations futures obtenaient ces caractères par hérédité. En commençant l'appivoisement du loup il y a 15 000 ans, est venu ensuite la domestication du bétail dont les vaches lors de la révolution agricole vers -9000 (Frantz et al., 2020) Cette méthode empirique a permis l'obtention de races spécialisées dont l'exploitation des productions au profit de l'Homme était plus facile.

Pour répondre à la forte augmentation de la demande en produits lactés entre 1930 et 1970, **la recherche en élevage laitier se concentre alors principalement sur un objectif : augmenter la quantité de lait produite** (Miglior et al., 2017). A cette fin, deux stratégies se dessinent : d'une part **augmenter la taille des élevages** laitiers en nombre d'individus et d'autre part améliorer la génétique des cheptels pour **augmenter la quantité de lait produite par animal**. Cependant l'ancienne méthode d'amélioration de la race par sélection des meilleurs reproducteurs n'est pas une stratégie systématique car la méthode d'évaluation des « bons » ou « mauvais » reproducteurs est très observateur-dépendante. Une avancée majeure fut **l'établissement de critères de sélection** précis, universels donc internationaux pour un phénotype observé (Becker and McGilliard, 1929). Les caractéristiques d'un taureau étaient évaluées par rapport aux performances de ses filles, plus ceux-ci étaient améliorateurs, et plus la demande de leur semence était forte. La **pression de sélection se fit donc plus sur les mâles** car à partir d'un même taureau on obtenait de nombreuses filles dont l'obtention d'une moyenne de production était plus représentative que celle d'une vache. (Miglior et al., 2017). Ces critères sont variés et évoluent selon les périodes et les régions. On retrouve bien sûr la quantité de lait produite parmi les premiers critères, mais aussi (liste non exhaustive) la conformation, la fertilité, la longévité, la facilité de vêlage, le tempérament et plus récemment la santé (résistance aux mammites, maladies métaboliques, affections podales, etc...). L'ensemble des critères se retrouve dans des registres propres à chaque race, la Prim'Holstein possède également le sien : « Advanced Register for Guernsey and Holstein ». On parle **d'index de sélection multi-trait évalué sur le pedigree**. Un même taureau pouvant être utilisé pour l'insémination de nombreuses femelles, le **nombre de taureaux reproducteurs peut être diminué** afin de ne garder que ceux qui sont améliorateurs par rapport à la moyenne de la population. Les résultats sont sans appel : la production de lait a plus que doublé sur les cinquante dernières années (Lf et al., 2021), démontrant l'efficacité de ce modèle de sélection génétique.

C'est en 2009 en France que les choses s'accélérent grâce à **l'avènement de la génomique au sein des schémas de sélection** (Doublet et al., 2019). La génomique se définit comme l'étude des génomes, soit les séquences d'ADN des êtres vivants. En 2009 est publié la première séquence du génome complet d'un bovin (The Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium et al., 2009). Ces données ont permis **de cartographier le génome bovin** et donc d'identifier certains gènes avec



leur expression et leurs fonctions dans l'organisme. Les éleveurs souhaitant améliorer leur troupeau peuvent désormais souscrire à un service d'amélioration génétique utilisant un nouveau moyen : le génotypage. Le génotypage consiste en une lecture simplifiée de l'ADN qui permet de prédire la valeur génétique d'un individu sans nécessiter la réalisation d'un séquençage du génome complet (Robert-Granié et al., 2011). Les mécanismes de cette nouvelle technologie sont décrits dans la partie I) C). Cette méthode, moins coûteuse que le testage sur la base des phénotypes sur la descendance, s'est vite démocratisée. En effet, les qualités des taureaux étaient anciennement évaluées via l'évaluation de leurs filles. La réalisation de ces tests s'étalait sur environ cinq ans. Cette période ajoutée à l'âge de prélèvement de la semence du mâle représentait une durée de 5 à 10 ans avant de savoir si le taureau testé serait conservé comme reproducteur ou non (Doublet et al., 2019). Or, la sélection génomique a permis de supprimer cette phase de test donc ne pas mettre à la reproduction des taureaux dont les qualités sont moindres, ce qui a réduit le nombre de reproducteurs. De plus, l'évaluation des capacités du taureau pouvant se faire plus précocement, l'âge de mise à la reproduction a également baissé. Enfin, le **sexage de la semence**, soit la possibilité de garantir le sexe du produit, permet d'optimiser et de rentabiliser encore plus l'utilisation de la génomique en favorisant la production d'individus femelles dans le cas des accouplements entre animaux à haute valeur génétique. **L'intervalle de temps entre les générations et le nombre de reproducteurs diminuant, le taux de consanguinité augmente au sein des troupeaux** (Doublet et al., 2019). La consanguinité se définit comme l'accouplement entre individus apparentés ce qui conduit moléculairement à **l'augmentation de la probabilité que les deux allèles d'un gène proviennent du même ancêtre** (Häfliger, 2022).

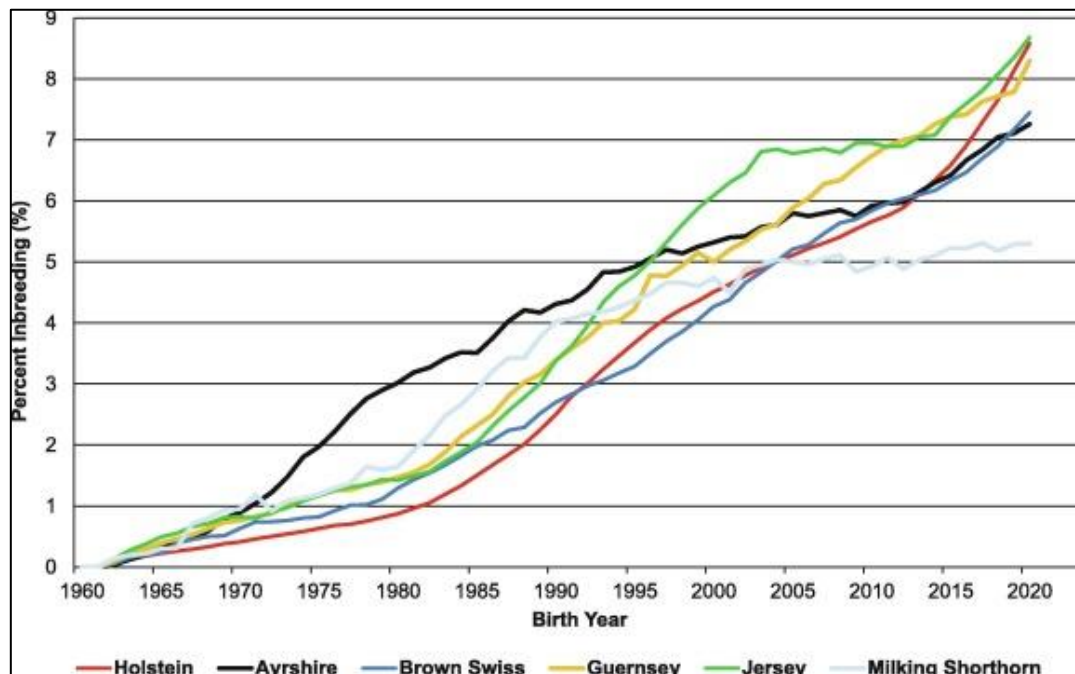


Figure 4 : Evolution au cours des soixante dernières années du coefficient de consanguinité de six races laitières de l'espèce bovine dans les six pays principaux producteurs

(Lf et al., 2021)

La conséquence de cette augmentation de la consanguinité est une réduction **du nombre d'allèles différents et l'augmentation relative du nombre de variants délétère** dans la population bovine conduisant à une faible diversité génétique (Fritz *et al.*, 2016). Or une population à faible diversité génétique présente deux désavantages majeurs : d'une part elle s'adapte moins en cas de changement de son environnement ou d'apparition de nouveaux pathogènes ; et d'autre part cela entraîne une **diminution des performances** de production, de fertilité, de résilience immunitaire et donc de longévité (Lf *et al.*, 2021). La sélection sur le volume de lait a donc eu des conséquences néfastes sur d'autres aptitudes des descendants. **La gravité de ces conséquences augmentant avec l'intensification de l'utilisation du génotypage.** Par exemple, aux Etats-Unis, l'intervalle vêlage-vêlage (IVV) a augmenté de 0,5 mois entre les années 60 et 80, mais de deux mois entre les années 80 et 2000 (Gutiérrez-Reinoso *et al.*, 2022). La faible diversité génétique est également la cause de l'augmentation de la fréquence d'apparition d'anomalies génétiques (VanRaden and Miller, 2006), dont les mécanismes seront développés dans le paragraphe suivant.

#### 4- Les anomalies génétiques bovines

##### a. *Qu'est-ce qu'une anomalie génétique ?*

On appelle anomalie génétique une variation du phénotype, le plus souvent délétère, causée par une mutation sur la séquence ADN. La modification de cette séquence résulte principalement de deux procédés : une anomalie chromosomique de type réarrangement (cassure et liaison) ou une mutation nucléotidique. Lorsqu'une mutation nucléotidique apparaît dans la séquence codante d'un gène et que celle-ci entraîne une modification du cadre de lecture ou de la séquence de la protéine traduite (mutation non synonyme), une altération de la fonction de cette protéine et du fonctionnement de l'organisme peut apparaître. Cette altération peut être considérée comme « favorable » -pour les systèmes de production ou l'individu – si elle correspond à un caractère bénéfique comme dans le cas des mutations « sans cornes » ou « culard » ; ou bien « défavorable » lorsque la modification du phénotype n'est pas viable ou dégrade la santé ou la production.

Tableau 1 : Présentation des conséquences des mutations de l'ADN sur les chaînes protéiques transcrites

Réalisé par l'auteur

Modification de l'ADN	Type de mutation	Conséquences sur la chaîne protéique	Conséquences sur l'individu
Substitution d'un nucléotide /SNV	<u>Synonyme</u>	Aucune	Aucune
	Ou <u>Non-synonyme</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Faux sens/ <i>missense</i></li> <li>• Non-sens /<i>nonsense</i> (apparition d'un codon STOP)</li> </ul>	Modification d'un AA  Raccourcissement	Fonction protéique modifiée  Protéine non fonctionnelle
Insertion/délétion de bases azotées multiple de 3	Insertion Délétion	Allongement Raccourcissement	Protéine non fonctionnelle
Insertion/délétion de bases azotées non multiples de 3	Décalage du cadre de lecture et apparition d'un codon stop / <i>frameshift</i>	Raccourcissement	Protéine non fonctionnelle

**Le phénotype est l'expression du génotype.** Le génotype correspond à l'ensemble des chromosomes, qui sont présents en deux exemplaires : l'un d'origine maternelle et l'autre d'origine paternelle. Certaines mutations ne s'expriment phénotypiquement que lorsqu'elles sont présentes sur les deux chromosomes : on parle alors de **déterminisme autosomal récessif**. Ce mécanisme de transmission est le plus fréquent dans l'espèce bovine car il concerne **60% des anomalies identifiées** (Ducos et al., 2003). D'autres mutations s'expriment phénotypiquement dès qu'elles sont présentes sur un seul des deux chromosomes quelle que soit son origine paternelle ou maternelle : on parle dans ce cas de **déterminisme autosomal dominant**. Les anomalies génétiques peuvent également être dues à des mutations présentes sur les chromosomes sexuels ; leur proportion dans la population dépendra alors du sexe de l'individu. Enfin d'autres déterminismes dits non Mendéliens permettent également la transmission d'anomalies génétiques.

### b. Déterminisme autosomal récessif

Le déterminisme autosomal récessif concerne les individus exprimant le phénotype en question qui sont porteurs d'une mutation d'un gène non sexuel pour lequel ils sont homozygotes. **Ce type de mutation dite récessive peut être transmise à de nombreuses générations sans être repérée.** En effet les individus hétérozygotes n'exprimant pas l'anomalie, ils sont mis à la reproduction et leur descendance peut être porteuse sans modification perpétuant à son tour la transmission. (Duchesne et al., 2016)

D'après la loi d'Hardy-Weinberg : pour un gène donné ayant deux allèles A (de fréquence p) et B (de fréquence q), la proportion des différents phénotypes chez les individus de la population est de :  $[AA]= p^2$  ;  $[AB] = 2pq$  ;  $[BB]=q^2$ , A étant l'allèle sauvage et B l'allèle muté. La fréquence d'individus homozygotes mutés BB malades est donc de  $q^2$ , avec q la fréquence de la mutation. Or, d'après (*Présentation sur les affections héréditaires bovines, Ducos 2022*) on considère que pour détecter une anomalie génétique, il faut qu'un veau sur mille environ exprime l'anomalie (en supposant que les signes cliniques soient facilement identifiables). Dans le cas d'une anomalie à déterminisme autosomal récessif il faut donc que la proportion d'individus homozygotes à la mutation soit de  $q^2=0.001$  soit  $q= 0.031$  soit environ 3%. **Pour être détecté, l'allèle doit déjà être présent à une fréquence de 3% dans la population.** A ce stade-là, les hétérozygotes sont au nombre de  $AB = 2pq = 2(0,03*0,07) = 0,042$  soit 4,2%. On remarquera que  $(0,042) / (0,001) = 42$  donc **il y a 42 fois plus de porteurs sains que d'homozygotes.**

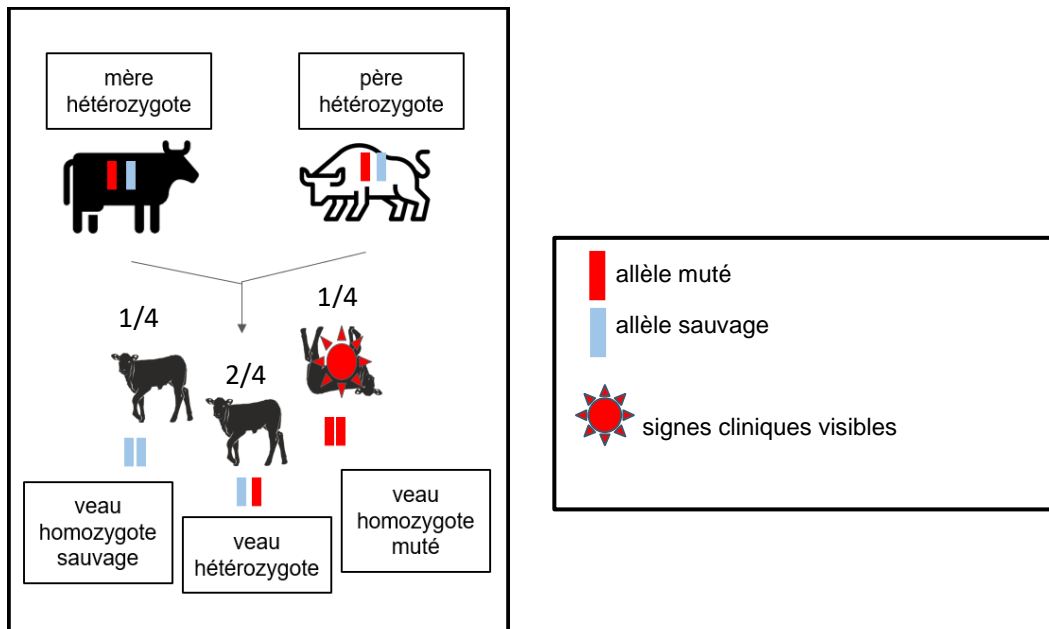


Figure 5 : Mécanisme de transmission d'une anomalie génétique de déterminisme autosomique récessif

Diagramme réalisé par l'auteur

**Les accouplements entre un individu hétérozygote et un individu homozygote sauvage permettent la propagation de l'allèle muté sans qu'il puisse être repéré car porté par des animaux hétérozygotes sains.**

*Exemple de la vache Milka :*

Les vaches dites « Milka » sont un exemple de déterminisme autosomal récessif. Ce sont des vaches de race Montbéliarde qui ont une dilution de la couleur de la robe dans les zones normalement pigmentées en brun rouge. En 2021, la mutation causale est découverte par l'INRAe et Alice (Floriot et al., 2021) : elle résulte de la substitution d'une glycine par une alanine dans le gène FZD7. Cette mutation n'est pas défavorable : sur les 106 individus atteints dans l'étude précitée, aucun problème de santé n'a été observé en lien direct avec la mutation. Elle est présente aujourd'hui chez de nombreux individus en France : la fréquence de l'allèle muté est de 3,7 % chez les bovins de race Montbéliarde.



Figure 6 : Photographies de veaux Montbéliard à gauche et d'un veau Montbéliard « Milka » à droite

(“Observatoire National des Anomalies Bovines -”) (“Montbéliarde Association ”)

### *c. Déterminisme autosomal dominant*

Le déterminisme autosomal dominant concerne les animaux atteints phénotypiquement porteurs d'une mutation d'un gène pour lequel ils sont hétérozygotes ou homozygotes. Ces anomalies sont **visibles sur un grand nombre d'animaux** ; il est alors plus simple de repérer les individus porteurs et de ne pas les faire reproduire. Les animaux atteints **apparaissent subitement en grand nombre et disparaissent très vite** par sélection naturelle et/ou absence de mise à la reproduction des porteurs. (Boichard et al., 2016).

En reprenant l'exemple précédent, où B est l'allèle muté, les individus AB et BB sont atteints. Avec un allèle muté dont la fréquence est de 3%, 0,1% d'homozygotes mutés et  $2 \times 0,97 \times 0,03 = 5,8$  % d'hétérozygotes sont présents dans la population.

**Ainsi, quasiment 6% des individus sont porteurs d'une anomalie visible, ce qui est assez facilement détectable dans une population.**

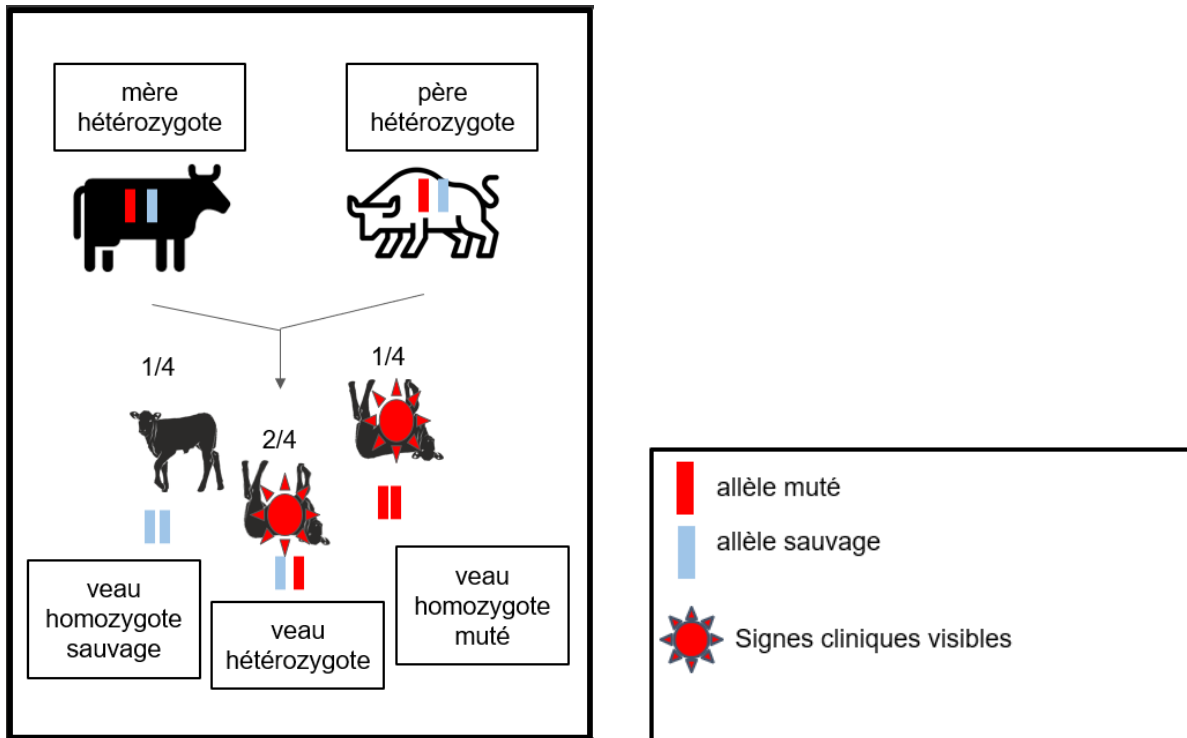


Figure 7 : Mécanisme de transmission d'une anomalie génétique de déterminisme autosomique dominant

Diagramme réalisé par l'auteur

Exemple des veaux bouledogue :

L'achondrogénésie de type II est une *mutation à déterminisme autosomal dominant* : c'est une délétion de 3,5 kb sur le gène *COL2A1* (Jacinto et al., 2021). Cette délétion conduit à la réduction de la production de collagène de type II. Elle fait partie des mutations à l'origine des veaux dits *bouledogue* qui ont un défaut de croissance des os longs. Il en résulte des corps comprimés et raccourcis non viables. (Reinartz et al., 2017). Les veaux hétérozygotes et homozygotes à la mutation étant atteints, l'anomalie est vite repérée et les veaux ne se reproduisent pas ce qui conduit inévitablement à la disparition de l'anomalie.





Figure 8 Photographie d'un veau Holstein atteint d'achondrogénésie

(Reinartz et al., 2017)

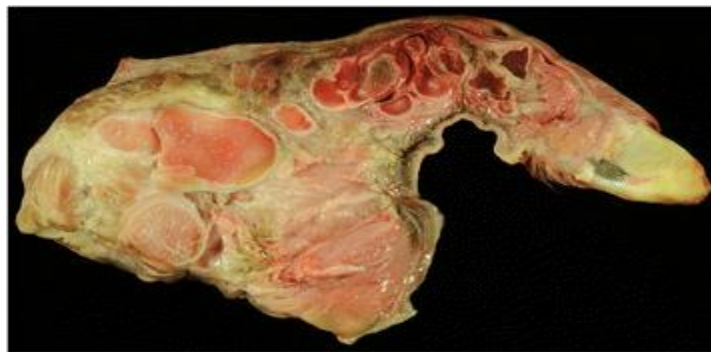


Figure 9 : coupe longitudinale d'un membre du sujet atteint

(Reinartz et al., 2017)

## B) L'Observatoire National des Anomalies Bovines : description, fonctionnement et intérêt

Dans un contexte où les **anomalies bovines sont de plus en plus fréquentes** (Didier Boichard et al., 2016), les vétérinaires et éleveurs ont organisé une surveillance. Il n'existait jusqu'alors aucun dispositif officiel pour les recenser ou les étudier. L'Observatoire National des Anomalies Bovines (ONAB) a été créé en 2002 par l'initiative du département de génétique animale de l'INRAe pour répondre à cette demande (Grohs et al., 2016). L'ONAB regroupe des acteurs publics (les quatre écoles vétérinaires françaises ENVF et la Fédération Nationale des Groupements de Défense Sanitaire FNGDS) et privés (L'Institut de l'élevage IDELE, ELLIANCE, Races de France, Société Nationale des Groupements Techniques Vétérinaires SNGTV) (Duchesne et al., 2016). Via la réalisation de signalements et de prélèvements (sang sur tube EDTA et/ou biopsie d'oreille) (Grohs et al., 2016) par les différents acteurs de la filière, l'ONAB recense et regroupe les cas d'anomalies génétiques cliniquement détectables. **Avec ces données, la surveillance des anomalies est plus précoce et la gestion de leur éradication plus rapide.** Plus les signalements sont nombreux, et plus cette démarche est efficace ; il est donc important de faire connaître les actions de l'ONAB auprès des différents acteurs de la filière.

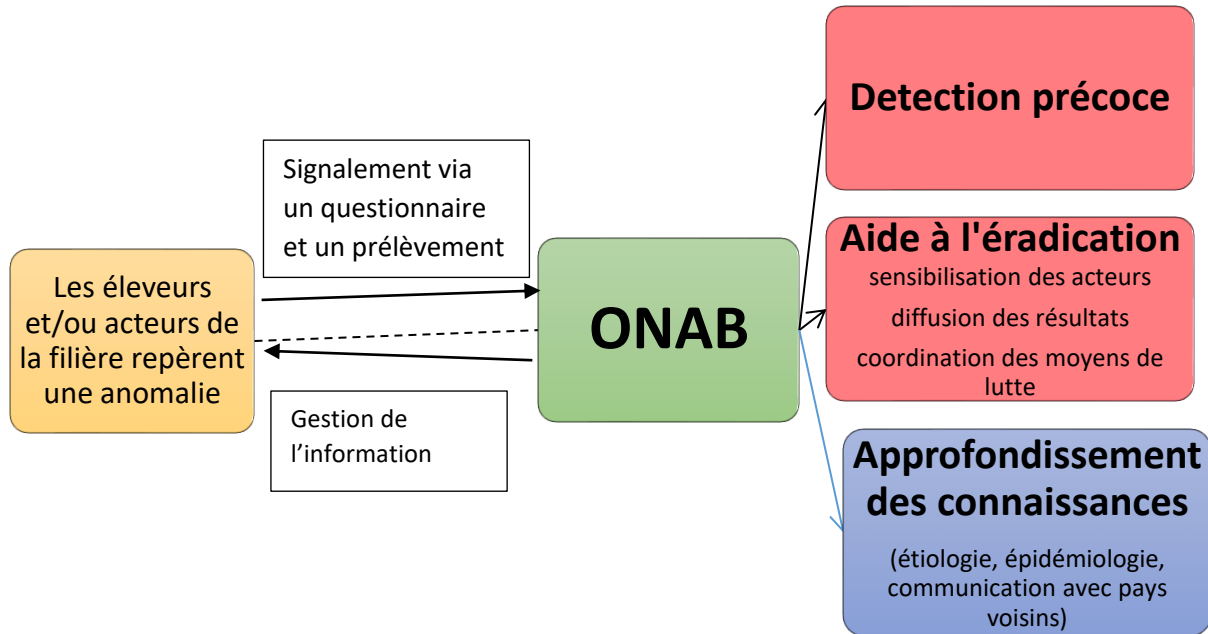


Figure 10 : Actions et objectifs de l'ONAB

Diagramme réalisé par l'auteur

Cette première approche qui consiste à repérer l'anomalie *de visu* pour collecter l'ADN afin de déterminer la mutation causale est une démarche de type « bottom-up » car la progression a lieu de l'observation clinique vers l'identification de l'origine génétique. Plus récemment, l'ONAB a adopté une nouvelle stratégie de surveillance et de prévention des anomalies génétiques : **repérer les mutations délétères associées à de la mortalité via les données de génotypage afin d'en établir les conséquences phénotypiques. On appelle cette approche « top down » car la démarche débute avec l'identification d'une mutation pour rechercher la ou les anomalies génétiques associées chez les animaux porteurs.** (Grohs et al., 2016)

### C) Détection des anomalies génétiques par l'approche classique : du phénotype à la mutation causale

L'identification d'une anomalie génétique repose sur la collection de cas à partir des observations cliniques. Ces cas n'ont pas besoin d'être très nombreux, quelques dizaines de cas étant suffisant la plupart du temps, voire quelques unités (Duchesne et al., 2016). L'éleveur ou tout autre acteur de la filière doit repérer la présence d'une anomalie chez un nouveau-né et la décrire à l'aide d'un formulaire qui est disponible en ligne sur le site de l'ONAB (*visible en annexe*). **Cette description étant opérateur-dépendante et à l'origine de nombreux biais, il est important qu'elle soit réalisée de façon précise et rigoureuse. La prévention et l'information des éleveurs via le vétérinaire traitant est donc essentielle.** Le signalement est dans l'idéal



accompagné d'un prélèvement de tissu contenant de l'ADN comme par exemple une **biopsie de l'oreille** ou bien du sang (prélevé dans un tube EDTA) (Duchesne et al., 2016). Les tissus concernés par l'anomalie peuvent également être prélevés pour être exploités ultérieurement pour la connaissance des mécanismes fondamentaux. Par exemple si le derme de l'animal est très distendu et peu élastique comme dans le cas de la dermatosparaxis, un prélèvement de peau pourra être réalisé et envoyé à l'ONAB. Il est important de rappeler que cette démarche est non rémunérée et fonctionne sur le **principe du volontariat**.

A partir des différents signalements, la première étape est de vérifier si une origine génétique est possible. Pour cela, le pedigree, c'est à dire l'ascendance généalogique des animaux signalés est établi. La base d'identification nationale (BDNi) est consultée par l'INRAe. Le numéro d'identification à dix chiffres permet de connaître l'ascendance jusqu'à la génération n-4. **Lorsqu'on trouve un ancêtre commun parmi les animaux porteurs de l'anomalie, il y a suspicion d'une origine génétique de l'affection rapportée.**

Afin de confirmer la présence d'une anomalie génétique et mieux la caractériser, il faut identifier la mutation causale. Ainsi, à partir des prélèvements biologiques, il est possible d'extraire un échantillon d'ADN pour rechercher l'anomalie de séquence.

Premièrement, il est important de ne pas associer à une même cause des signes cliniques similaires mais non identiques : c'est ce qu'on appelle une **hétérogénéité de déterminisme**. Seuls les échantillons issus des animaux d'une **même race** et ayant un **ancêtre commun** (l'individu premier porteur de la mutation) sont pris en compte. **Ces échantillons d'ADN sont comparés à des échantillons témoins d'animaux non atteints afin d'identifier des différences au sein de leurs génomes.** Plus les animaux témoins sont nombreux, plus l'analyse est puissante. Pour cela le génome des individus retenus est cartographié. La cartographie génétique, consiste à positionner de façon relative des locus, avec comme objectif la mise en évidence de liaisons avec des caractères d'intérêt (Cribiu and Schibler, 2000). La cartographie utilisée dans ce cas précis est un **génotypage de l'ADN**. Le séquençage complet du génome n'est pas nécessaire, **la lecture de certains marqueurs spécifiques et pertinents est suffisante à l'évaluation du génome de l'individu.** Ces marqueurs sont des **SNP** (Single Nucléotide Polymorphism), soit **des nucléotides** (Adénine, Thymines, Guanine, Cytosine) **répartis le long du génome à des intervalles compris entre 100 ou 1000 bases** qui peuvent être substitués par un autre nucléotide en comparaison de la séquence des animaux témoins. Un bon marqueur génétique a les propriétés suivantes :

- Il est suffisamment **polymorphe** pour qu'il soit possible de suivre facilement les transmissions alléliques entre parent et produit ;
- Il est **codominant**, c'est-à-dire que les différents allèles sont bien identifiés ;
- Il est **facile à typer**, avec un taux d'erreur et un taux de génotypes indéterminés faibles, et un coût de génotypage bas ;

Ces marqueurs doivent être suffisamment **nombreux** pour couvrir la totalité du génome avec une densité suffisante.

Ces SNP sont localisés dans des QTL (Quantitative Trait Loci) qui engendrent la majeure partie de la variabilité génétique entre les individus. **La précision de la prédiction de la valeur génétique repose sur le génotypage d'un millier d'individus environ, dont on connaît le phénotype, et sur la relation statistique entre les marqueurs et les caractères associés.**

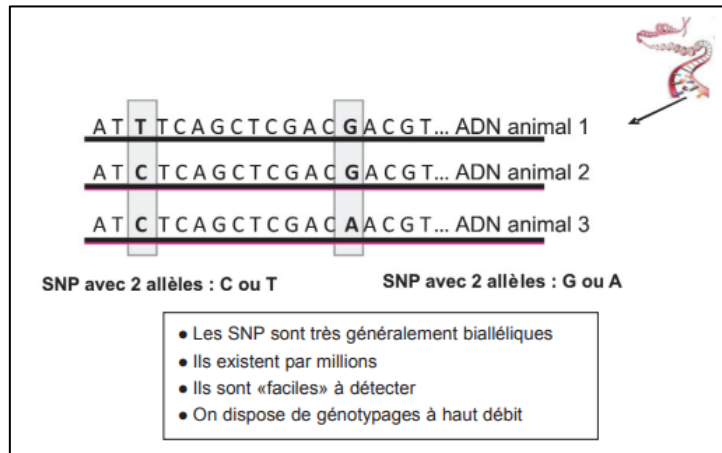


Figure 11 : Illustration simplifiée de deux SNP

(Robert-Granié et al., 2011)

Aujourd'hui le génotypage des bovins est réalisé à l'aide de **puces SNP 54K** : elles contiennent 54 000 SNP, soit en moyenne un marqueur toutes les 45 000 bases. Ainsi les échantillons d'ADN sont analysés à l'aide de ces puces SNP afin de trouver les marqueurs à chaque position analysée. Un segment de la séquence ADN contenant plusieurs SNP communs entre les animaux et qui détermine un trait particulier est appelé un **haplotype**. Ainsi les individus signalés ayant ce segment de SNPs communs en deux exemplaires sont homozygotes ; s'il n'est présent qu'en un seul exemplaire, ils sont hétérozygotes ; et les individus témoins ne le portent pas. **En théorie, si l'atteinte phénotypique est effectivement due à une anomalie génétique à déterminisme autosomal récessif (cas le plus fréquent), tous les échantillons ADN des individus signalés doivent être homozygotes à l'haplotype. On peut faire l'hypothèse forte selon laquelle la mutation se trouve au sein de ce segment.** Cette approche a cependant des limites établies comme décrit par Duchesne et al. En effet, il peut exister des individus :

- Faux-positifs *si l'haplotype existait avant l'apparition de la mutation et a été conservé, ces individus seront porteurs du segment sans la mutation*
- Faux-négatifs *s'il y a eu des recombinaisons au sein de l'haplotype et qu'il n'est donc pas détecté car légèrement différent alors que la mutation est toujours présente dans la séquence haplotypique.*

Cet haplotype ciblé, car présent dans les échantillons d'ADN des animaux suspects, fait en général quelques mégabases (Duchesne et al., 2016) contre trois milliards de paires de bases pour l'ensemble du génome bovin ("Bovine Genome Assembled" 2022). Le séquençage de cet haplotype plus court est beaucoup moins couteux. Si dans ce segment on retrouve un gène dont la fonction semble avoir un lien avec l'anomalie observée chez les animaux homozygotes, il est très probable que le variant se situe au sein de ce gène ("Observatoire National des Anomalies Bovines - Vers l'identification de la mutation causale," 2012). **La séquence du segment est alors comparée à celle du même segment dans le groupe de référence** : les nucléotides qui diffèrent de la séquence témoin sont appelés les **variants**. Ces variants sont triés par traitement bio-informatique selon plusieurs critères établis par les équipes de l'INRAe en 2016 :

1. Critère intra-racial = présent uniquement chez la race concernée
2. Critère d'homogénéité = présent chez tous les individus atteints
3. Critère d'exclusivité = absent chez les non porteurs/ les animaux témoins
4. Si la mutation est supposée létale à l'état homozygote :  
Critère de mortalité = absence d'animal homozygote vivant

Après application de ces filtres, une dizaine de variants sont retenus comme probables candidats pour l'identification de la mutation causale. Il faut alors confronter le résultat aux **connaissances actuelles du rôle des gènes fonctionnels contenant ces variants** à l'aide d'une recherche bibliographique. En comparant la fonction de ces gènes, telle qu'elle a été décrite chez l'homme ou la souris, aux signes cliniques décrits chez les animaux signalés, il est possible de déterminer le variant causal, et donc la mutation causale. Le rôle de chaque gène étudié peut être retrouvé sur ("MGI-Mouse Phenotypes, Alleles & Disease Models,"), (Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM; <http://www.omim.org>) ou encore (Mammalian Phenotypes; <http://www.informatics.jax.org>)

Par ailleurs, une étude bibliographique permet parfois d'identifier d'autres anomalies cliniquement proches et causées par une autre mutation du ou des mêmes gènes fonctionnels, mais dans une autre espèce. Aujourd'hui, le séquençage total de l'ADN à partir des échantillons des animaux signalés est de plus en plus utilisé car plus accessible. Le principe de fonctionnement reste le même qu'avec le génotypage mais requiert un plus petit nombre d'individus (Häfliger, 2022).

#### D) La génétique inverse, une méthode novatrice dans la recherche d'anomalies

La méthode précédente permet de décrire des anomalies phénotypiques en leur associant une mutation causale, et ainsi de confirmer le caractère génétique de l'affection. Cependant, **certaines anomalies phénotypiques ne sont pas facilement identifiables** : c'est le cas lorsque les modifications sont peu spécifiques et difficiles à distinguer d'autres affections, ou qu'elles sont discrètes du point de vue clinique. De même, une anomalie causant de la mortalité dès le stade embryonnaire peut être

interprétée comme une baisse de fertilité de la mère. Face à cette situation, l'hypothèse d'une anomalie génétique n'est qu'assez peu souvent envisagée. Pour contourner cette difficulté, une nouvelle approche de la recherche des anomalies génétiques a été développée. Cette méthode permet de rechercher des anomalies qui auraient été confondues avec d'autres affections. (Shahzad and Loor, 2012)

## 1-Recherche des régions du génome avec un déficit en homozygotes

**Le principe de la génétique inverse est l'identification d'une anomalie génétique sans observation préalable du phénotype particulier.** Les travaux de VanRaden en 2011 ont été pionniers dans l'établissement de la méthode (VanRaden et al., 2011) en permettant la découverte de cinq anomalies récessives conduisant à des avortements. L'hypothèse est la suivante : « **si une anomalie génétique est létale lorsqu'un individu est homozygote pour la séquence responsable, il n'existe pas d'individu homozygote vivant dans la population** ».

La généralisation du génotypage dans les élevages français permet d'obtenir des informations sur la séquence génomique d'un très grand nombre d'animaux. Ces données sont collectées et analysées afin de repérer des variations significatives de l'équilibre d'Hardy-Weinberg. Au sein d'INRAe, le logiciel utilisé est « FINDHAPLO ». Une fenêtre déroulante de 20 marqueurs SNP parcourt ainsi le génome de tous les animaux génotypés, et **signale lorsqu'un ensemble de SNP (l'haplotype) n'est pas ou très peu présent à l'état homozygote**. La taille de la fenêtre déroulante de 1,5 mégabases (mb) permet de mieux cibler l'haplotype : ni trop court pour qu'il puisse exister dans la population sans contenir la mutation et ni trop long pour éviter les risques de recombinaison. **Le variant délétère serait alors en déséquilibre de liaison avec l'haplotype candidat**. Cela signifie qu'ils sont assez proches dans le génome pour être présents à côté dans le génome des individus porteurs malgré les multiples recombinaisons chromosomiques ayant eu lieu au cours des générations successives.(Georges et al., 2019)

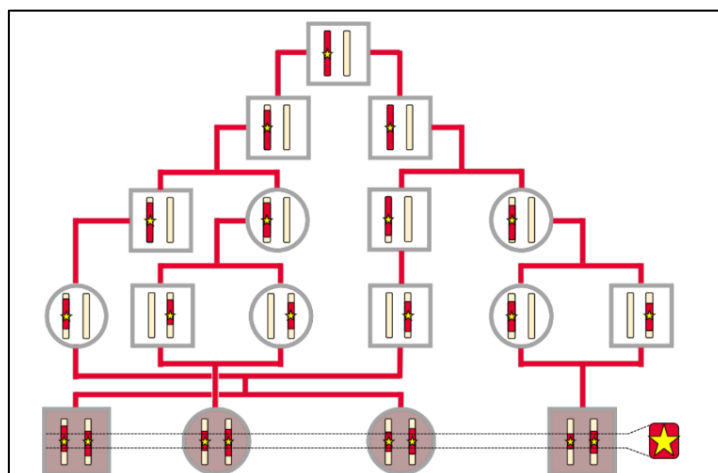


Figure 12 : Illustration du principe de déséquilibre de liaison du variant délétère (étoile jaune) avec l'haplotype (en rouge)

(Georges et al., 2019)

Selon Fritz, on attend un nombre d'homozygotes E à un haplotype k donné selon la formule :

$$E(k) = \sum_{i=1}^{n_p} p_{ik} \sum_{j=1}^{n_{gpm}} 0,5(q_{jk} + f_k) n_{ij}$$

« avec  $n_p$  le nombre de pères,  $n_{gpm}$  le nombre de grand-pères maternels,  $p_{ik}$  la probabilité de transmission de l'haplotype  $k$  par le père  $i$  à ses descendants,  $q_{jk}$  la probabilité de transmission de l'haplotype  $k$  par le grand-père maternel  $j$  à ses filles,  $f_k$  la fréquence de l'haplotype  $k$  dans la population,  $n_{ij}$  le nombre de descendants issus du père  $i$  et du grand-père maternel  $j$ . La probabilité de transmission de l'haplotype  $k$  ( $p_{ik}$  ou  $q_{jk}$ ) est égale à 1 pour un taureau homozygote à l'haplotype  $k$ , 0,5 pour un taureau hétérozygote et 0 pour un taureau non porteur » (Fritz, 2016)

On compare alors le nombre d'homozygotes obtenu avec le logiciel *Findhaplo* qu'on appelle  $O(k)$  à cet  $E(k)$  calculé. **L'haplotype  $k$  est retenu comme potentiel candidat lorsque  $O(k)$  est significativement inférieur à  $E(k)$ , avec une confirmation que la différence est statistiquement significative par un test du  $\chi^2$ .**

## 2- Les haplotypes candidats porteurs de variants délétères établis par l'ONAB

Les haplotypes identifiés par déficit en homozygotes sont appelés « candidats » car possiblement associés à des variants délétères à l'origine de la mortalité observée. Comme décrit dans la méthode fondée sur le phénotype, une fois les haplotypes candidats repérés, on ne retient que ceux dont la fréquence est supérieure à 1 % (Fritz, 2016). Les principaux haplotypes récessifs délétères identifiés par cette méthode rendus publics en France et en Suisse sont listés dans les tableaux ci-dessous : (Häfliger, 2022)

Race	Haplotype	Chromosome	Intervalle (Mb)	E(k)	O(k)	Fréquence (%)
Holstein	HBV	21	20,2-22,3	49	0	3,6
Holstein	HH1	5	61,4-66,2	18	0	2,6
Holstein	HH3	8	94,0-96,5	21	0	2,5
Holstein	HH4	1	1,9-3,3	49	0	3,6
Holstein	HH5	9	92,1-93,2	22	0	1,4
Holstein	CVM1	3	49,4-52,6	91	38	4,6
Holstein	CVM2	3	45,8-47,6	68	24	3,9
Montbéliarde	MH1	19	27,6-29,4	131	0	9
Montbéliarde	MH2	29	27,9-29,1	80	1	7
Montbéliarde	MH3	6	73,3-74,4	122	14	7,1
Normande	NH1	24	38,1-39,2	12	0	1,8
Normande	NH2	11	51,1-54,2	31	0	3,7

$E(k)$  = Espérance d'homozygotes pour l'haplotype  $k$  sous l'hypothèse neutre  
 $O(k)$  = nombre d'homozygotes effectivement observés pour l'haplotype  $k$   
 HBY est l'haplotype associé à l'anomalie brachyspina  
 CVM1 et CVM2 sont deux haplotypes associés à l'anomalie CVM

Tableau 2 : Principaux haplotypes rendus publics associés à des déficits d'individus homozygotes en France  
(Fritz, 2016)

phénotype	haplotype	gene	OMIA	type of variant	breed	ref
Ptosis, intellectual disability, retarded growth and mortality (PIRM) syndrome	AH1	UBE3B	<a href="#">001934-9913</a>	SNV (splice site)	Finnish Ayrshire	[117]
Abortion	AH2	RPAP2	<a href="#">002134-9913</a>	SNV (splice site)	Ayrshire	[118]
Juvenile mortality	BH2	TUBD1	<a href="#">001939-9913</a>	SNV (missense)	Brown Swiss ; Fleckvieh	[103,119]
Fanconi-Bickel syndrome	FH2	SLC2A2	<a href="#">001958-9913</a>	SNV (missense)	Fleckvieh ; original braunvieh	[110,120]
Abortion	FH4	SUGT1	<a href="#">001960-9913</a>	SNV (missense)	Fleckvieh	[110]
Embryonic lethality	HH1	APAF1	<a href="#">000001-9913</a>	SNV (nonsense)	Holstein	[103,109,121]
Embryonic lethality	HH2	IFT80	<a href="#">001823-9913</a>	SNV (frameshift)	Holstein	[103,122,123]
Abortion	HH3	SMC2	<a href="#">001824-9913</a>	SNV (missense)	Holstein	[103,107,108,123]
Abortion	HH4	GART	<a href="#">001826-9913</a>	SNV (missense)	Holstein	[109]
Abortion	HH5	TFB1M	<a href="#">001941-9913</a>	gross deletion	Holstein	[81]
Embryonic lethality	HH6	SDE2	<a href="#">002149-9913</a>	SNV (start lost)	Holstein	[124]
Embryonic lethality	HH7	CENPU	<a href="#">001830-9913</a>	5 bp deletion (splice site)	Holstein	[125]
Embryonic loss	JH1	CWC15	<a href="#">001697-9913</a>	SNV (nonsense)	Jersey	[103,126]
Abortion	MH1	PFAS	<a href="#">001827-9913</a>	SNV (missense)	Montbéliarde, Vorderwald	[127]
Abortion	MH2	SLC37A2	<a href="#">001828-9913</a>	SNV (nonsense)	Normande	[109]
Abortion	NH7	CAD	<a href="#">002201-9913</a>	SNV (missense)	Holstein	[128]
Abortion		RABGGTB	<a href="#">002037-9913</a>	SNV (missense)	Holstein	[129]
Abortion		RNF20	<a href="#">002038-9913</a>	SNV (nonsense)	Holstein	[129]
Abortion		T1F1	<a href="#">002036-9913</a>	SNV (nonsense)	Holstein	[129]

Tableau 3 : Principaux haplotypes rendus publics associés à des déficits d'individus homozygotes en Suisse  
(Häfliger, 2022)

En 2019, à INRAe, 34 nouveaux haplotypes d'une taille variant de 1 à 4,8 Mb et de fréquences comprises entre 1,8 et 9%, ont été détectés pour l'ensemble des trois races laitières françaises (Prim'Holstein, Montbéliarde et Normande). Ces haplotypes candidats potentiellement associés à une anomalie génétique délétère sont aujourd'hui encore étudiés afin de déterminer la localisation précise des variants et la pathogénie associée.

La recherche de variants délétères au sein des haplotypes repérés se fait à l'aide de 1184 génomes d'animaux séquencés dont 333 Holstein, 160 Montbéliarde et 160 Normande : c'est la population de référence. En appliquant les filtres de sélection dont nous parlions dans la partie C), on identifie ces variants prédits délétères en déséquilibre de liaison avec les haplotypes sélectionnés.

Après une recherche bibliographique de la possible pathogénie de ces variants, ils sont ajoutés aux puces SNP 54K utilisées en génotypage de routine afin de trouver des porteurs homozygotes vivants. INRAe peut alors déterminer les phénotypes associées à ces mutations en partenariat avec les écoles vétérinaires dans le cadre de travaux de recherche. Dans cette optique, en 1992, 359 veaux issus d'accouplements à risque pour l'anomalie du BLAD (Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency) ont été élevés et suivis cliniquement à Oniris (Ecole vétérinaire de Nantes) afin de mieux étudier la physiopathologie notamment l'atteinte sur la croissance et la longévité ("Observatoire National des Anomalies Bovines - BLAD," 2019).

### 3-Identification du variant sur le gène *ITGB7* au sein de l'haplotype candidat

Cette thèse décrit l'étude de l'anomalie associée à l'un des haplotypes identifiés par INRAe : le H5P25 présent sur le chromosome 5 dans la région du gène *ITGB7* dans l'espèce bovine et la race Prim'Holstein. Dans la population Prim'Holstein étudiée, 411 738 animaux témoins (père et grand-père maternels non porteurs de l'haplotype) et 92 966 cas (père et grand-père maternel porteurs hétérozygotes de l'haplotype) ont été identifiés.

Afin de faire ressortir les variants candidats associés à une mortalité juvénile tardive, un filtre supplémentaire comparant les régions déficitaires chez les vaches et les génisses a été appliqué : enrichissement minimum de 25% du nombre d'homozygotes chez les génisses mortes avant la mise à la reproduction et déficit de 25 % chez les vaches encore vivantes en postpartum. Le variant repéré sur l'haplotype H5P25 par l'application de ce filtre et les précédents se nomme T.G375S. C'est une mutation ponctuelle de la protéine *ITGB7* impliquant la substitution d'une glycine en une sérine à la position 375.



#### 4- Intérêt de l'étude de la longévité pour la recherche d'anomalies génétiques

La description de la longévité permet de savoir à quel stade physiologique, la mort (ou la réforme) se produit, et de savoir ainsi si la mortalité est **plutôt précoce ou plutôt tardive**. Cette information permet d'évaluer le **préjudice économique** lié à l'anomalie. En effet plus une anomalie provoque une mortalité, et plus les coûts induits sont grands pour l'éleveur : pertes liées à l'élevage de l'animal avant sa période productive dont les coûts d'alimentation, coût des différents traitements médicaux appliqués, occupation des bâtiments, etc...

La première étape est l'identification des anomalies génétiques liées à une réduction de la longévité. Une fois les régions candidates identifiées, des **courbes de survie des individus candidats, c'est-à-dire possiblement porteurs de l'haplotype sont décrites**. En raison du trop faible nombre d'individus génotypés, tous les individus ayant un père et un grand-père maternel possédant l'haplotype sont comptabilisés ; ils ont alors une probabilité de **12,5 %** de porter l'anomalie, soit des dizaines de milliers d'animaux. Via les données de la BDNI, les dates de naissance et de mort, la cause de la mort ou de la réforme de ces individus sont connues. Les résultats donnent alors une tendance approximative mais statistiquement acceptable. L'allure de la courbe de survie permet de caractériser le type de mortalité.

Une courbe de ce type a été réalisée pour le variant *ITGB7*. Les courbes du graphique de gauche de la figure 14 ci-dessous représentent **l'écart du nombre d'individus entre le groupe testé (1) et le groupe témoin (0)** non porteur de l'haplotype, en fonction de l'âge. A un temps fixé pour chacun des deux groupes, les proportions d'animaux vivants (cohorte V), d'animaux morts (cohorte M) et d'animaux réformés pour la boucherie (cohorte B) sont indiquées. Par exemple le nombre V1 correspond au nombre d'individus vivants possiblement porteurs de l'haplotype.

**Dans le cas du variant ITGB7, la mortalité est tardive** car le pic est atteint, quand l'écart entre V1 et V0 est le plus grand, vers 1868 jours (visible avec une étoile jaune sur le graphique de gauche).

Le graphique de droite de la figure 14 représente **l'écart en pourcentage** entre les animaux potentiellement porteurs et non porteurs de l'haplotype dans chaque catégorie (M, B, V) en fonction de l'âge (en jours). Sur la courbe rose (écart entre les morts des deux catégories), il y a deux pentes différentes : la première est plus forte indiquant une forte mortalité entre 0 et 500 jours notée (1), la deuxième est moins marquée (2), et indique qu'ensuite, la mortalité est moindre et étalée dans le temps. Sur la courbe bleue, il y a une décroissance de l'écart entre les vivants jusqu'à -5 % vers 1800 jours (pic de mortalité). L'écart négatif signifie que pour chaque âge (en jours), il y a plus d'animaux morts dans le groupe des animaux possiblement porteurs (groupe 1) que dans le groupe des animaux témoins (0).



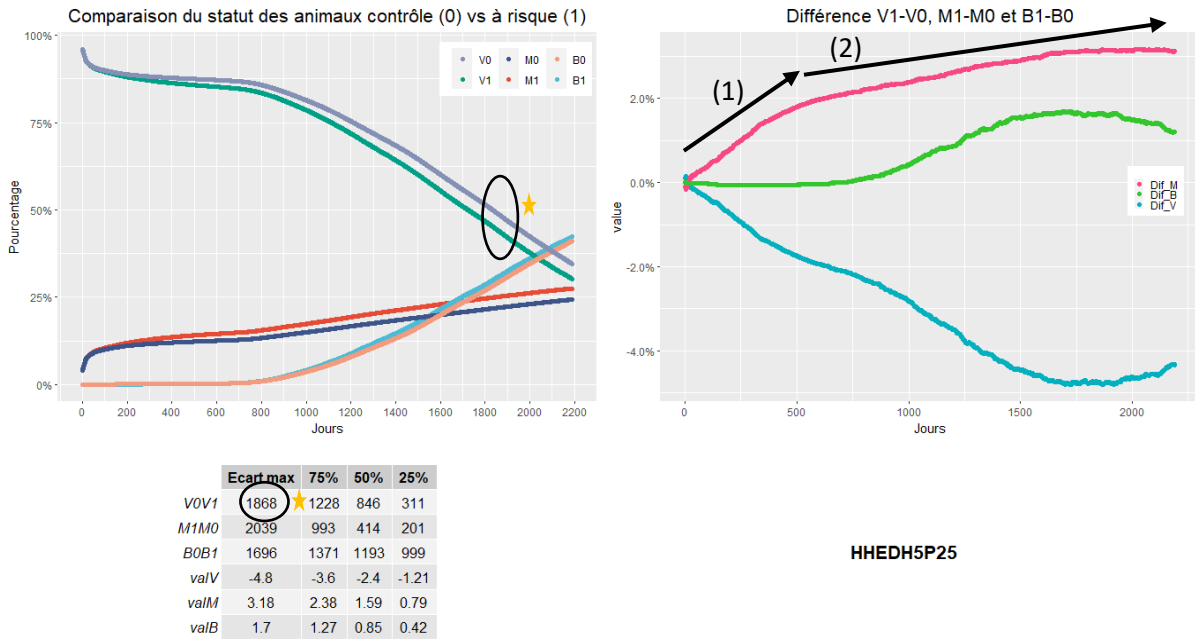


Figure 13 : Courbes de survie en relation avec la mutation sur le gène ITGB7

Avec l'aimable autorisation de l'auteur Ana Guintard, étudiante à Agro Campus Ouest en 2021

## E) Conduite à tenir après l'identification d'une anomalie génétique affectant la longévité

### 1- A l'échelle de la filière, choix de la stratégie de gestion de l'anomalie

Une fois l'anomalie établie, il convient de **déterminer si son impact économique justifie son éradication**. En effet, certains des phénotypes liés à l'anomalie sont neutres (exemple de la vache Milka), voire avantageux (exemple du gène sans corne).

Ensuite, **l'allèle muté peut présenter un avantage sélectif chez les hétérozygotes**. Ces individus auront tendance à être plus nombreux dans la population ce qui entraîne une **sélection dite équilibrante**. Elle fait référence à l'équilibre qui s'installe entre la sélection artificielle favorisant les hétérozygotes porteurs de l'allèle muté et la sélection naturelle éliminant les homozygotes pour cet allèle (Didier Boichard et al., 2016). Par exemple, Kadri et al ont décrit en 2014, une délétion de 660-Kb qui est létale à l'état homozygote, car elle entraîne des avortements précoces, mais la production de lait est plus élevée avec de meilleurs taux à l'état hétérozygote (Kadri et al., 2014). En race Blanc-Bleue-Belge, les individus ayant une délétion au sein du gène *MRC2* sur les deux chromosomes présentent un phénotype désavantageux : queue tordue, parésie spastique des membres postérieurs, retard de croissance, hypertrophie musculaire extrême. Lorsqu'elle est présente en un seul exemplaire, cette mutation est moins exprimée et les symptômes sont réduits et dans ce cas, tolérés et même avantageux pour le système de production (Fasquelle et al., 2009). Dans les deux cas, les hétérozygotes sont présents en plus grand nombre dans la population car ils ont un phénotype avantageux.

Après avoir déterminé si un effet pléiotrope existait, l'impact économique doit être évalué. **Le poids économique s'estime comme la variation de revenu associée au changement apporté par le caractère dans un système de production donné, à paramètres extrinsèques fixés** (D. Boichard et al., 2016b). En nommant la fréquence des homozygotes « fh », la fréquence des hétérozygotes « fht », et leur coût respectivement « ch » et « cht », le coût d'une anomalie sera  $C = (fh \times ch) + (fht \times cht)$ . Dans le cas d'une anomalie récessive sans effet pléiotrope connu comme pour *ITGB7*, seuls les homozygotes seront associés à un surcoût, le coût de l'anomalie sera  $C = fh \times ch$  (D. Boichard et al., 2016b). On comprend aisément que plus la fréquence f de l'anomalie est élevée (corrélée à fh), plus le coût total lié à l'anomalie augmente et plus la gestion devient urgente. Or la fréquence f de l'allèle *ITGB7* est d'environ 5 %. On distingue deux types de coûts : (liste non exhaustive)

- **Les coûts directs** : traitements médicaux, dystocie, entretien alimentaire de l'individu, occupation du bâtiment d'élevage, échecs à l'insémination/mortalité embryonnaire
- **Les coûts indirects** : perte de valeur des taureaux hétérozygotes, perte de progrès génétique sur l'objectif de sélection, dégradation d'image de la race

Les anomalies présentées dans le tableau ci-dessous engendrent des coûts différents. Les anomalies associées à une mortalité embryonnaire ont un coût de 40 \$, celles associées à une mortalité fœtale ont un coût de 70 \$ et enfin celles liées à une mortalité juvénile (brachyspina, Mulefoot et BLAD) un coût de 150 \$. On constate que plus la mortalité est tardive et plus le coût est élevé.

Anomalie	Fréquence (f, en %)	Coût par animal c, (en \$)
Brachyspina	2,76	150
HH1	1,92	40
HH2	1,66	40
HH3	2,95	40
HH4	0,37	40
HH5	2,22	40
BLAD	0,25	150
CVM	1,37	70
DUMPS	0,01	40
Mulefoot	0,07	150

Tableau 2 : Estimation du coût c par animal en fonction de la fréquence de dix anomalies génétiques dans la population Holstein américaine

(Cole, 2015)

Une fois le coût estimé, on doit choisir la stratégie à employer face à l'anomalie

- 1ere option : **éliminer tous les porteurs** (homozygotes et hétérozygotes)

Autrefois, les anomalies génétiques étaient éradiquées via l'abattage systématique des tous les porteurs de l'anomalie. Or, avec le développement de nouvelles méthodes de détection, cette approche n'est plus envisageable car elle conduirait à l'abattage

d'un trop grand nombre d'animaux (Cole, 2015). Cette méthode reste cependant encore aujourd'hui obligatoire pour les anomalies autosomales dominantes. (D. Boichard et al., 2016b)

- 2eme option : **écarter les porteurs mâles de la reproduction**

Lorsque la fréquence de l'anomalie est peu élevée et que les taureaux porteurs hétérozygotes sont peu diffusés (souvent à cause d'une moins grande valeur génétique), une solution simple pour l'éradication de l'anomalie est la réforme des taureaux porteurs (Cole, 2015). Les taureaux d'insémination sont presque tous génotypés, ce qui permet de savoir facilement leur statut génétique à l'anomalie. Cette méthode est utilisée également lorsque le coût de l'anomalie est bas pour les femelles porteuses ce qui justifie de ne pas les réformer immédiatement. Enfin, pour la confiance des utilisateurs (les éleveurs acheteurs de paillettes de taureaux d'insémination), les taureaux déclarés publiquement porteurs d'une anomalie sont souvent retirés de la vente.

- 3eme option : **repérer les individus porteurs et éviter les accouplements à risque**

De nos jours, la plupart des anomalies récessives sont gérées de cette manière. Avec les informations sur l'haplotype seul, il est possible de réaliser la phase de tri des candidats dans les programmes de sélection (D. Boichard et al., 2016b). En revanche, une prédiction par haplotype permet de fournir un statut assez précis pour un ensemble d'individus, mais toujours avec un pourcentage d'erreur, l'association étant rarement absolue. Par précaution, il est important de séquencer la totalité du génome d'un taureau hétérozygote s'il est de haute valeur génétique en typant pour la mutation causale identifiée afin d'éviter une dépréciation commerciale inutile. (D. Boichard et al., 2016b). Une fois que le statut des taureaux d'insémination à l'anomalie est certain, ces résultats sont communiqués aux centres d'insémination et aux opérateurs. Ceux-ci doivent par la suite informer les potentiels acheteurs de paillettes afin de mettre en place un plan d'accouplement adapté. Il faut alors, dans les élevages génotypant leurs femelles, **ne pas inséminer une porteuse hétérozygote à l'anomalie avec un de ces taureaux**. Lorsque les femelles ne sont pas génotypées, il faut vérifier le statut du père de la femelle à inséminer. Si le père est porteur hétérozygote, la probabilité d'obtenir un produit homozygote par l'accouplement de sa fille et d'un autre taureau hétérozygote est de  $1/(4x(2-f))$  soit environ 12,5% ; l'insémination doit donc être évitée. **Par cette méthode, la fréquence de l'anomalie est divisée par deux à chaque génération** (D. Boichard et al., 2016b).

D'autres mesures peuvent également être utilisées comme l'inscription de l'anomalie à la liste des affections pour lesquelles les reproducteurs destinés aux échanges nationaux et internationaux doivent être garantis non porteurs. (D. Boichard et al., 2016b).

Anomalie	Mode de gestion de l'anomalie pour les taureaux destinés à la monte publique	Documents à fournir
BLAD (« Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency »)	Le statut du taureau doit être connu  Pour être testé sur descendance, le taureau doit être non porteur	Pedigree  <u>Ou</u> analyse ADN faite à Labogéna par un laboratoire agréé ICAR
CVM (« Complex Vertebral Malformation »)	Tout taureau né avant janvier 2003 et mis sur le marché doit avoir un statut connu  Pour être testé sur descendance, tout taureau né depuis janvier 2003 doit être non porteur	<u>Ou</u> certificat issu d'un laboratoire agréé ICAR  <u>Ou</u> déduction du typage des ascendants, certifiée par une association de race agréée reconnue par l'UE
Brachyspina	Le statut du taureau doit être connu  A partir de juin 2013, pour être testé sur descendance, le taureau doit être non porteur	

Tableau 3 : Liste des anomalies génétiques réglementées pour l'accès des taureaux Holstein à la monte publique mis à jour au 04/05/2012

Tableau réalisé par l'auteur d'après (PRd ideale, 2012)

## 2-A l'échelle des acteurs de la filière : outils de gestion à disposition

Jusqu'à récemment, les anomalies génétiques étaient gérées de façon inadaptée par les acteurs de la filière. Si l'anomalie était très visible, les individus atteints pouvaient être éliminés sans faire l'objet de déclaration. De même, les anomalies génétiques n'étaient pas prises en compte dans les schémas de sélection (D. Boichard et al., 2016a). Aujourd'hui, les nouveaux outils de génotypage permettent d'obtenir l'information sur le statut génétique de l'animal. **Cette information est rapidement mobilisable pour les éleveurs et autres opérateurs. L'anomalie, une fois identifiée, est ajoutée sur les puces de génotypage utilisées en sélection génomique le plus précocement possible.** On parle de **test génétique indirect** qui permet de faire le tri entre porteurs et non porteurs sans être fiable à 100 %. Cela permet d'avoir une confirmation statistique de l'ampleur de la fréquence de l'anomalie. Cette étape peut être réalisée avant d'avoir trouvé la mutation causale, ce qui permet une action plus précoce et plus efficace. Dans un deuxième temps, le statut de l'individu à certaines anomalies figure sur les résultats du génotypage transmis aux éleveurs. Cette information permet à l'éleveur d'éviter les accouplements à risque en évaluant le risque d'une mise à la reproduction pour le renouvellement.

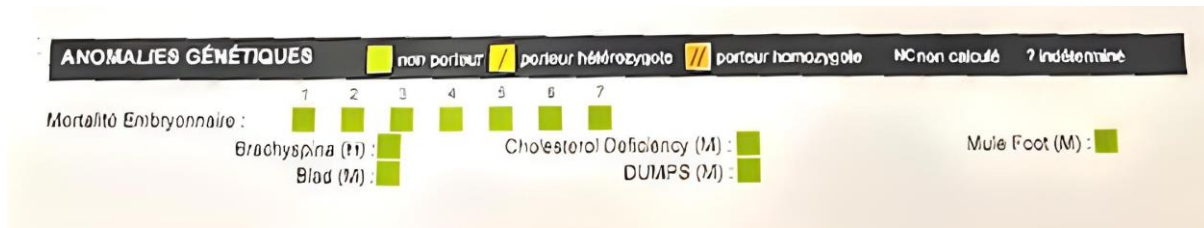


Figure 14 : Mention des anomalies génétiques sur les feuilles de résultats de génotypage pour la race Prim Holstein

Source personnelle, résultats anonymisés

## II) Etude bibliographique sur le gène *Itgb7* et possibles conséquences physiopathologiques en lien avec la mutation

Le génome bovin comporte 60 chromosomes dont 58 autosomes et 2 chromosomes sexuels. Dans la partie précédente, nous avons exposé la méthode permettant à partir de données de génotypage de remonter jusqu'à la mutation causale. Cette méthode a permis la découverte de 34 anomalies génétiques dont le variant délétère du gène *Itgb7*.

Le gène *Itgb7* est situé sur le **chromosome 5** dans l'intervalle [26,7-26,8] mégabases (mB) (Elsik et al., 2016).

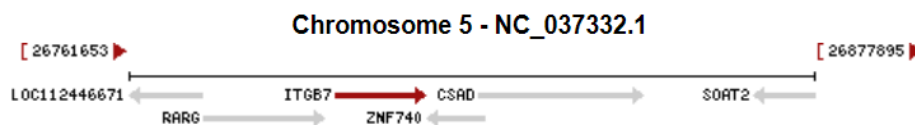


Figure 15 : Localisation du gène *Itgb7* sur le chromosome 5 dans l'espèce bovine (*Bos taurus*)

(“ITGB7 integrin subunit beta 7 [*Bos taurus* (cattle)] - Gene - NCBI,” 2020)

### A) Le gène *Itgb7*

Le gène *Itgb7* est présent chez de nombreuses espèces du règne animal et chez l'Homme. Sa présence a été confirmée au sein du génome des espèces séquencées suivantes : Homme (*Homo sapiens*), ovin (*Ovis aries*), caprin (*Capra hircus*), chien (*Canis lupus familiaris*), cheval (*Equus caballus*), rat (*Rattus norvegicus*), cochon (*Suis scrofa*) (Elsik et al., 2016). La **séquence du gène étant très conservé** chez de nombreux mammifères, on considère qu'il est probablement très ancien. Il code pour l'intégrine  $\beta 7$ . D'après l'article de Hynes, les intégrines sont apparues il y a probablement 500 millions d'années au cours de la période cambrienne. Au cours de l'évolution, les intégrines ont subi une forte pression de sélection, qui a conduit à la diversification de leurs structures et de leurs fonctions. Ce sont des **récepteurs dont les fonctions sont diverses** : adhésion entre les cellules, adhésion des cellules à la matrice extracellulaire, adhésion du cytosquelette à la membrane cellulaire, activation

de signaux intra-cellulaires, en plus de leur liaison à un ligand. Elles sont présentes chez tous les métazoaires, et absentes chez les procaryotes, plantes et champignons. (Hynes, 2002).

## 1- Structure moléculaire, assemblage

Le gène *Itgb7* peut être transcrit en 5 ARN messagers différents dans l'espèce bovine ; ils sont traduits en deux chaînes polypeptidiques aussi appelées protéines : A7YWN9 et F6RKH9 d'une longueur respective de 800 et 873 acides aminés. F6RKH9 fait partie du protéome mais n'a pas de fonction définie à ce jour. **A7YWN9 est la protéine correspondant à la dénomination intégrine  $\beta 7$**  (Elsik et al., 2016).

L'ensemble des acides aminés formant la chaîne polypeptidique correspondant à la structure primaire. Des liaisons hydrogène se forment au sein de cette molécule pour former des hélices alpha et des feuillets bêta ; c'est la structure secondaire. Ensuite, cette chaîne subit un repliement sur elle-même à l'aide d'autres protéines chaperonnes via la formation de ponts disulfure, de liaisons hydrogène et de pôles hydrophobes/hydrophiles, c'est la structure tertiaire tridimensionnelle. (Luo et al., 2016).

**L'intégrine  $\beta 7$  est une protéine transmembranaire.** La structure tridimensionnelle comprend : un long domaine extracellulaire, une hélice transmembranaire et un court domaine cytoplasmique. On retrouve également des domaines EGF et EGF-like (epidermal growth factor) et une « gliding motility » lipoprotéine Cg1D ("ITGB7 integrin subunit beta 7 [Bos taurus (cattle)] - Gene - NCBI," 2020)

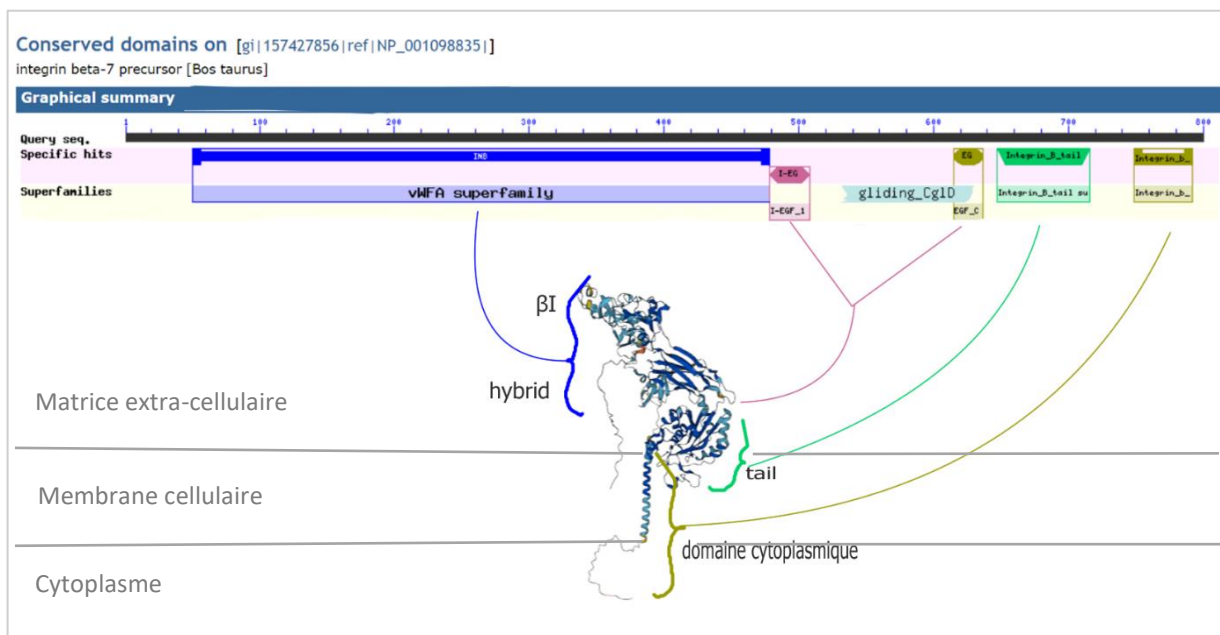


Figure 16 : Domaines conservés de la protéine A7YWN9 et leur localisation dans la structure tridimensionnelle (représentation schématisée par assistance informatique)

("ITGB7 integrin subunit beta 7 [Bos taurus (cattle)] - Gene - NCBI," 2020)

L'intégrine  $\beta 7$  correspond à la sous-unité d'une molécule hétérodimérique par appariement à une chaîne alpha. En effet, le domaine extracellulaire se lie de façon non covalente avec une intégrine alpha pour former un complexe protéique capable de se lier à **son ligand qui est MAdCAM-1**, c'est la structure quaternaire de la protéine.

## 2- Les intégrines : expression et interactions avec les ligands

L'intégrine  $\beta 7$  fait partie de la **superfamille moléculaire des intégrines**. Les intégrines sont une famille de **récepteurs transmembranaires hétérodimériques qui interagissent en changeant leur conformation en présence de leur ligand spécifique** (Mezu-Ndubuisi and Maheshwari, 2021). Cette liaison permet des interactions avec d'autres cellules ou avec la matrice extracellulaire. Elles jouent de nombreux rôles dans l'organisme : survie cellulaire, immunité, thrombose, angiogenèse, etc... Chez les mammifères, on recense 24 intégrines en sous-unités  $\alpha\beta$  dont 18  $\alpha$  et 8  $\beta$  (Mezu-Ndubuisi and Maheshwari, 2021). Elles sont classées en 4 sous-familles selon leur type de ligand : les récepteurs de la séquence RGD (Arg-Gly-Asp), les récepteurs de la laminine, les récepteurs des collagènes et les récepteurs spécifiques des leucocytes dont fait partie l'intégrine  $\beta 7$  (Girard et al., 2015).

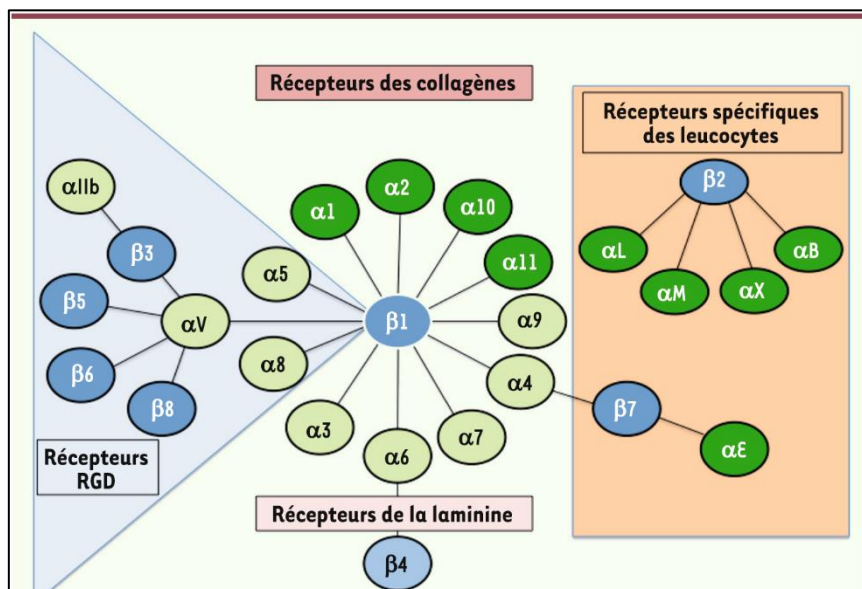


Figure 17 : La famille des intégrines

(Girard et al., 2015)

**L'intégrine  $\beta 7$  peut s'associer en liaison non covalente avec l'intégrine  $\alpha 4$  ou avec l'intégrine  $\alpha E$**  (Girard et al., 2015) (Sun et al., 2020) (Andrew et al., 1996) ("ITGB7 Gene - GeneCards | ITGB7 Protein | ITGB7 Antibody," 2020). Dans le cadre



de cette thèse, nous nous concentrerons plus particulièrement sur l'hétérodimère  $\alpha 4\beta 7$ .

L'intégrine beta 7 est exprimée préférentiellement à la surface des lymphocytes T (CD4 et CD8) et de leurs précurseurs, les thymocytes ; elle peut également être détectée à la surface des cellules dendritiques, des lymphocytes B, et des éosinophiles (Andrew et al., 1996). **Le dimère  $\alpha 4\beta 7$  est préférentiellement exprimé sur les lymphocytes T CD4, tandis que le dimère  $\alpha E\beta 7$  s'exprime plus sur les lymphocytes T CD8** (Andrew et al., 1996). Ces dimères forment un récepteur permettant l'adressage des lymphocytes vers la muqueuse intestinale notamment dans les plaques de Peyer. ("ITGB7 Gene - GeneCards | ITGB7 Protein | ITGB7 Antibody," 2020).

Le ligand spécifique de l'hétérodimère  $\alpha 4\beta 7$  est **MAdCAM-1** (mucosal addressin cell adhesion molecule-1) : une **molécule d'adhésion exprimée majoritairement à la surface de l'endothélium vasculaire du tractus digestif et respiratoire**. C'est une adhésine composée de deux immunoglobulines et d'un domaine mucin-like (motif répété de nombreuses fois de glycine, de sérine et de thréonine) (Yu et al., 2012). L'interaction fait intervenir le tripeptide L-D-T (Leu-Asp-Thr) ("ITGB7 protein expression summary - The Human Protein Atlas," n.d.). MAdCAM-1 est préférentiellement exprimée par les veinules hautes de l'endothélium épais (HEV) des plaques de Peyer et des nodules lymphoïdes mésentériques, mais aussi par les veinules postcapillaires de la lamina propria du petit et du gros intestin (Girard et al., 2015). Le dimère peut également parfois interagir avec **VCAM-1**, et avec la fibronectine de la matrice extracellulaire. ("ITGB7 protein expression summary - The Human Protein Atlas," n.d.)

Sur les 24 intégrines, 17 d'entre elles peuvent modifier leur conformation afin de transmettre un message depuis la matrice extracellulaire vers le compartiment intracellulaire ("ITGB7 Gene - GeneCards | ITGB7 Protein | ITGB7 Antibody," 2020). On distingue **trois états** :

- « **Courbée-fermée** » ou « bent-closed » qui correspond à la forme **inactive** du dimère et qui est la conformation majoritaire. L'affinité pour le ligand est faible (A)
- « **Étendue-ouverte** » ou « extended-open » qui correspond à la forme **active** du dimère. L'affinité pour le ligand est élevée (D)
- « **Étendue-fermée** » ou « extended-closed » qui correspond à une forme et une affinité intermédiaire, qui ne se lie pas au ligand (B). Lorsque la distance intramembranaire entre  $\alpha$  et  $\beta$  augmente, la liaison avec le ligand est possible (C) mais elle est peu stable (Yu et al., 2012).



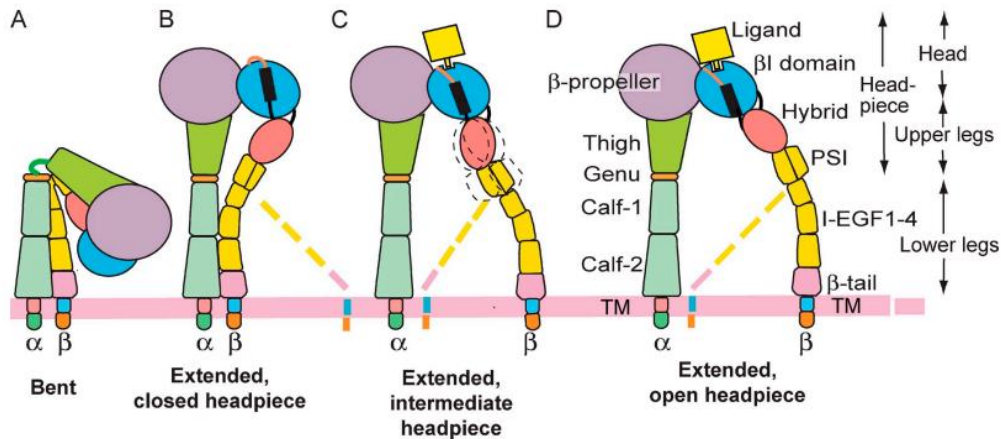


Figure 18 : Illustration schématique des différentes conformations possibles des intégrines

(Yu et al., 2012)

Les **contraintes mécaniques cellulaires** et/ou la **présence de chimiokines** autour du lymphocyte entraînent la formation d'un **signal dit « inside-out »** (Mezu-Ndubuisi and Maheshwari, 2021). Ce signal interne est transmis au domaine intracellulaire de l'intégrine qui induit le changement de conformation en passant de courbée à étendue, et donc d'activer le dimère (Girard et al., 2015). Une fois activée, **l'affinité pour le ligand augmente** car la position dans l'espace (passage de A à B) du site de liaison au ligand change : il est exposé et capable de se lier à MADCAM-1. Une fois la liaison avec le ligand établie, un **signal dit « outside-in »** est transmis au domaine cytoplasmique intracellulaire puis au cytosquelette du lymphocyte (Girard et al., 2015). Ce signal externe induit l'éloignement des « jambes » (passage de B à C) des intégrines (domaine cytoplasmique), ce qui a pour conséquence d'augmenter l'affinité pour le ligand et permet ainsi **la stabilisation du complexe formé**. (Mezu-Ndubuisi and Maheshwari, 2021).

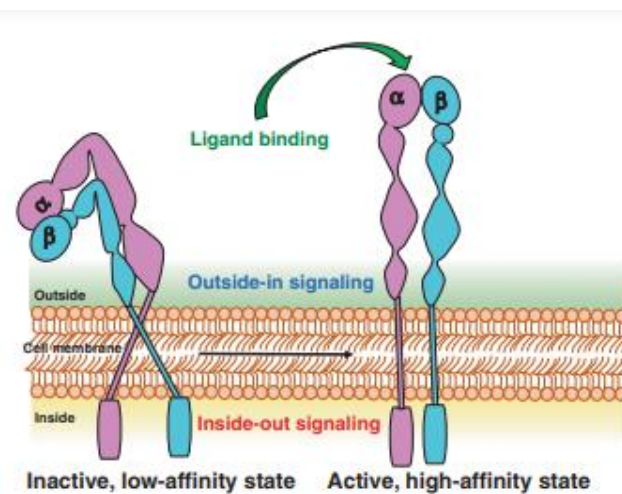


Figure 19 : Illustration schématique de l'activation des intégrines par les signaux « inside-out » et « outside-in »

(Mezu-Ndubuisi and Maheshwari, 2021)

### 3- Conséquences attendues de la mutation en termes fonctionnels

Prédire les conséquences fonctionnelles d'une mutation à l'aide de méthodes expérimentales peut s'avérer long et couteux. Une méthode informatique a alors été utilisée afin d'étudier les nouvelles mutations décrites notamment dans le cas de modification d'affinité avec un ligand. « **mCSM-PPI2** » fut l'un des premiers outils numériques permettant de quantifier précisément une modification d'affinité via l'évaluation de la conformation dans l'espace de la protéine mutée à l'aide de représentations graphiques (Rodrigues et al., 2019). Pour cela, des informations préalables sont nécessaires : l'espèce concernée, l'identité de la protéine, la nature et la localisation de la mutation qu'on cherche à étudier.

Dans le cas d'*Itgb7*, la mutation est une mutation **ponctuelle** non synonyme, et concerne la **substitution** d'un seul nucléotide : une base Guanine devient une Adénine. La traduction de la séquence protéique est également altérée (**mutation faux-sens**) : la Glycine à la position 307 devient une Sérine. **Or, cet acide aminé est situé à l'interface entre les deux intégrines.** La présence de la mutation ponctuelle entraîne une **diminution d'affinité entre  $\alpha 4$  et  $\beta 7$  estimée à  $-0.818$  Angstrom/mole**, d'après les données obtenues via le logiciel mCSM-PPI2. On peut faire l'hypothèse que **la diminution d'affinité perturbe l'expression du complexe  $\alpha 4\beta 7$  à la surface cellulaire et empêche la conformation « étendue-ouverte » qui est la forme active.** Comme nous l'avons vu précédemment, l'activation du complexe  $\alpha 4\beta 7$  est nécessaire à la liaison à MAdCAM-1, et la transduction du signal outside-in. (Yu et al., 2012). On peut supposer que ce signal outside-in sera moins bien transmis en présence de la mutation. Cette hypothèse s'appuie sur les articles de (Calderwood, 2004) et (Mezu-Ndubuisi and Maheshwari, 2021), dans lesquels une mutation dans la queue d'une l'intégrine (le domaine « tail ») entraînait une perturbation de la transduction du signal.

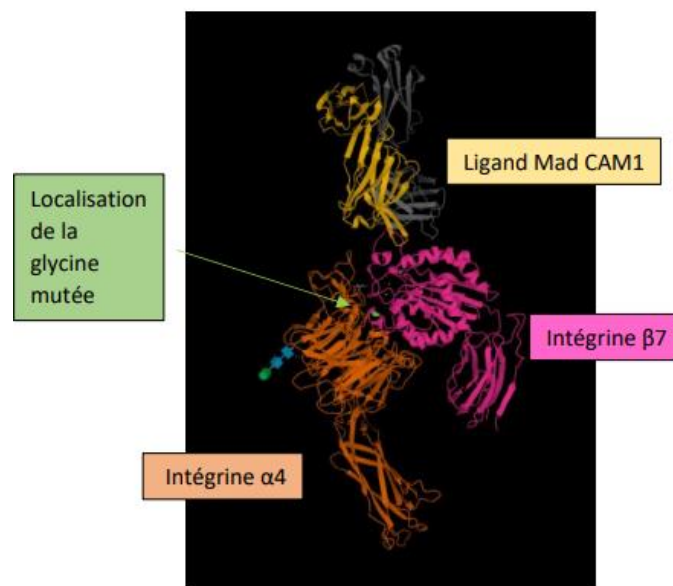


Figure 20 : structure tridimensionnelle prédite par assistance informatique du complexe LPAM-1 (dimère  $\alpha 4\beta 7$ ) et de son ligand MAdCAM-1

Obtenue via MSCM PPI 2 légendée par l'auteur

## B) Immunité digestive

### 1- Effecteurs cellulaires et organisation du système lymphoïde

A la naissance, le veau possède un système immunitaire compétent mais naïf. Son immunité repose sur le transfert d'immunoglobulines maternelles, majoritairement des IgG1 mais aussi des IgA, via le colostrum dans les six premières heures de vie. Elle dure en moyenne de 16 à 38 jours (Thiry et al., 2002).

Le veau entre en contact avec de nombreux pathogènes, notamment via les muqueuses, principalement buccale et nasale. En effet, celles-ci sont des barrières naturelles fines, fragiles et perméables. Ces contacts répétés avec les pathogènes vont provoquer la maturation du système immunitaire (Vlasova and Saif, 2021). De façon didactique, on distingue **l'immunité innée et l'immunité adaptative**. L'immunité innée est non spécifique, c'est-à-dire que les cellules effectrices (macrophages, phagocytes) sont capables de reconnaître des motifs communs à de nombreux pathogènes (PAMPS) ; c'est la réponse la plus précoce (à l'échelle de minutes). Elle permet d'éliminer plus de 99% des agents pathogènes. L'immunité adaptative est spécifique et implique d'autres types de cellules immunitaires : **les lymphocytes B et T qui s'activent via l'immunité innée en même temps que ou après que celle-ci se soit mise en place** (Abbas et al., 2020). Ces réponses sont dotées de mémoire, ce qui signifie qu'après développement d'une immunité spécifique contre un pathogène, une deuxième rencontre avec celui-ci entraînera une réponse plus rapide et plus efficace. On distingue les **effecteurs à médiation humorale et les effecteurs à médiation cellulaire**. Les immunoglobulines (principalement IgG1 et IgG2) sont produites par les plasmocytes (lymphocytes B matures) et permettent la neutralisation des pathogènes extracellulaires (virus, toxines), mais aussi l'agglutination et l'opsonisation bactérienne. Lorsque le pathogène est un agent intracellulaire, ce sont les lymphocytes à médiation cellulaire qui prennent le relais : les lymphocytes cytotoxiques (lymphocytes TCD8 matures). **Un autre type de lymphocyte T, le LT CD4 auxiliaire (helper), permet l'orchestration de la réaction immunitaire adaptative et la mémoire du contact avec un pathogène** (Vlasova and Saif, 2021).

**Le système lymphoïde est composé de l'ensemble des lymphocytes B et T (LB et LT) circulants et des organes lymphoïdes secondaires (OLS)** dont font partie les **MALTs** pour Mucosal Associated Lymphoid Tissues (tels que le GALT pour l'intestin, le NALT pour les voies aériennes respiratoires supérieures, le BALT pour les bronches...) (Abbas et al., 2020). Les MALTs permettent une **immunité locale au sein des muqueuses**. Quantitativement, le système immunitaire mucosal est plus étendu que le système immunitaire systémique puisqu'il représente environ 3/4 des lymphocytes totaux et produit la majorité des immunoglobulines chez l'individu sain. Le GALT (*gut-associated lymphoid tissue*) est le composant majeur du MALT : il regroupe plus de 40 % des lymphocytes totaux de l'organisme (Girard et al., 2015).

La paroi intestinale est organisée en quatre tuniques dans l'ordre depuis le lumen (lumière intestinale) vers le mésentère : *Les éléments du GALT sont en vert.*

1. La **muqueuse** composée de :
  - L'épithélium intestinal lui-même composé:
    - des villosités et microvillosités participant à l'absorption des nutriments
    - des cryptes : des invaginations de l'épithélium contenant des cellules souches permettant sa régénération
    - des **plaques de Peyer** (PP) contenant des **cellules immunitaires naïves** (LT, LB et DC) et couvertes de **cellule M** à sa face muqueuse.
  - La **lamina propria** : le tissu conjonctif contenant des cellules immunitaires activées
  - De nombreux **vaisseaux lymphatiques drainant la lymphe jusqu'aux nœuds lymphatiques mésentériques**
  - La **muscularis mucosae** ou musculaire-muqueuse : une fine couche de cellules musculaires lisses maintenant la surface de l'épithélium dans un mouvement léger et constant
2. La **sous-muqueuse** contenant de larges vaisseaux sanguins via lesquels transitent notamment les lymphocytes
3. La **musculaire** : deux couches de cellules musculaires lisses séparées par un réseau de nerfs permettant le péristaltisme
4. La **séreuse**, un tissu conjonctif lâche

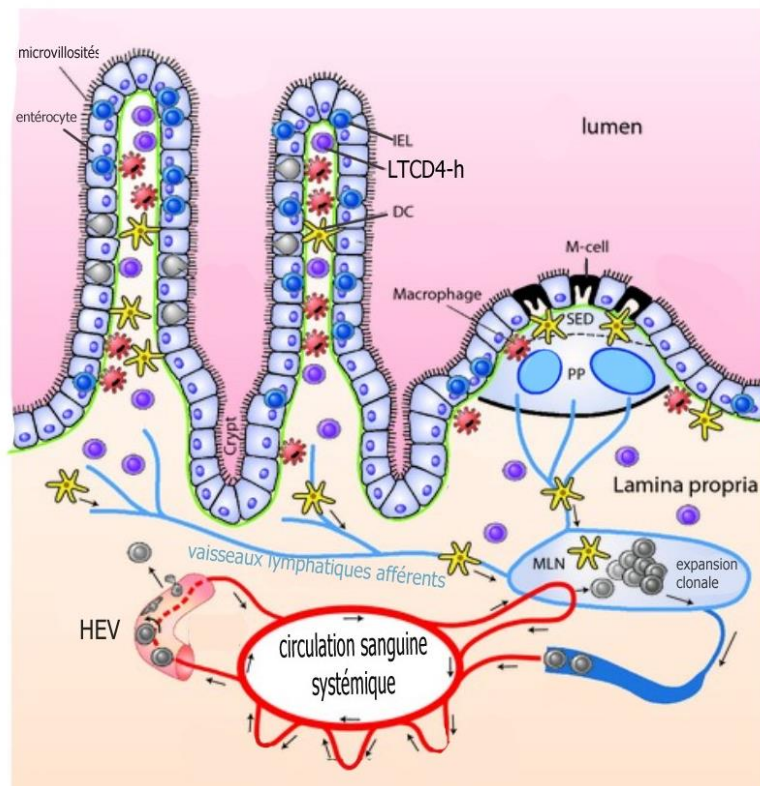


Figure 21 : schéma simplifié résumant le fonctionnement de l'immunité locale digestive au sein du GALT

(Marsal and Agace, 2012) modifié par l'auteur

Lorsqu'un pathogène est présent dans le tractus digestif, il est capté par **transcytose dans la cellule M** (M-cell) de la plaque de Peyer (PP). Les plaques de Peyer sont des petits dômes présents à la surface du jéjunum et de l'iléon, sans microvillosité et non couverts de mucus. La cellule dendritique muqueuse peut également capturer des pathogènes et leurs antigènes directement au niveau des villosités grâce aux expansions cytoplasmiques à travers l'épithélium. A cet endroit appelé **site inducteur**, le pathogène est présenté par des cellules dendritiques muqueuses (DC) à de multiples lymphocytes T CD4 naïfs (LTCD4) issus de la moëlle osseuse hématopoïétique et surtout du thymus. **Seuls les lymphocytes spécifiques de cet antigène doivent être activés et amplifiés.** Pour cela, trois signaux sont nécessaires : la reconnaissance spécifique via le complexe CMH-antigène/TCR, la costimulation, et l'immunomodulation. Après activation du lymphocyte, celui-ci abandonne son récepteur non spécifique CCR7 et exprime alors à sa surface, le CCR9. **La cellule dendritique muqueuse sécrète en parallèle de l'acide rétinoïque qui est à l'origine de l'expression du dimère  $\alpha 4\beta 7$  à la surface du lymphocyte.** Le lymphocyte T CD4 activé est alors drainé vers le nœud lymphatique mésentérique (MLN) puis il se divise lors de l'amplification clonale avant de rejoindre la circulation lymphatique. Après un passage par un OLS respiratoire, il retournera via la circulation sanguine dans la lamina propria, **site effecteur** du GALT (lymphocytes en violet sur le schéma). Ce phénomène se nomme le « **homing** » ou **adressage** en français. L'adressage se déroule en plusieurs étapes :

1. Le « **rolling** » ou **roulement** du lymphocyte le long de la paroi vasculaire, qui permet de **mettre en contact le dimère  $\alpha 4\beta 7$  avec le ligand MAdCAM-1 exprimé par les cellules endothéliales**
2. L'**adhésion** du lymphocyte à l'endothélium par la liaison non covalente du dimère  $\alpha 4\beta 7$  à MAdCAM-1, ce qui provoque l'arrêt du lymphocyte.
3. **La diapédèse** : la chimiokine CCL25 sécrétée par les cellules de la lamina propria est spécifique du récepteur CCR9 du lymphocyte, il y a alors extravasation de celui-ci depuis la circulation vers le site effecteur.

De la même manière, des lymphocytes T CD8 cytotoxiques (LTc) et des plasmocytes sont également recrutés. Les LTc activés sont adressés à l'épithélium intestinal ; on les appelle les **IEL** (*Intra-Epithelial Lymphocyte*). Dans la lamina propria, le ratio lymphocyte CD4/CD8 activés est de **3 LT CD4 pour 1 LT CD8**. Les LTc expriment l'intégrine  $\alpha E\beta 7$  qui leur permet d'adhérer à l'épithélium intestinal via une cadhérine (E-cadhérine ou CD103). (Defaweux, 2007).

D'autres types de leucocytes sont également présents dans les MALTs. On retrouve notamment des mastocytes, des cellules dendritiques, des macrophages et des éosinophiles (Abbas et al., 2020). Les éosinophiles sont des granulocytes jouant un rôle important lors des réactions de l'immunité innée. Leurs fonctions sont diverses : régulation des infestations parasitaires majoritairement mais aussi lutte contre certaines bactéries intracellulaires et modulation des réactions d'hypersensibilité de type I (Liesveld, 2022). On les retrouve, comme les LTCD8, dans la lamina propria dans le GALT. Les éosinophiles expriment également à leur surface, le complexe  $\alpha 4\beta 7$  (Brandt et al., 2006a) qui, de la même manière que pour les lymphocytes, régule leur adressage au GALT.



## 2- Conséquences fonctionnelles de l'absence ou de la mutation d'*Itgb7* sur l'immunité digestive

*Itgb7* est un gène très conservé permettant la synthèse de l'intégrine  $\beta 7$  pouvant se lier aux chaînes intégrines  $\alpha 4$  ou  $\alpha E$ . Unique parmi les intégrines, l'hétérodimère  $\alpha 4\beta 7$  permet l'adressage des lymphocytes activés depuis la circulation sanguine vers les muqueuses, majoritairement digestives (Yu et al., 2012) mais également respiratoires (Girard et al., 2015). Classiquement, ce sont les selectines des endothéliums vasculaires qui permettent l'adhésion des lymphocytes afin d'amorcer leur diapédèse vers un site inflammatoire (von Andrian and Engelhardt, 2003). **Cependant  $\alpha 4\beta 7$  est une exception car elle permet à la fois le « rolling » du lymphocyte mais aussi son adhésion à l'endothélium.** L'étude de (Yu et al., 2012) utilise la microscopie électronique et la cristallographie aux rayons X pour étudier la structure tridimensionnelle du dimère  $\alpha 4\beta 7$  dans différentes conditions : en présence de différents ligands (MAdCAM-1, un antagoniste de  $\alpha 4\beta 7$ , et un anticorps monoclonal utilisé en médecine humaine, le natalizumab), en clivant la boucle FG (phénylalanine-glycine), en induisant une mutation sur le domaine MIDAS (Metal ion dependant adhesion site) dans un milieu riche en ions  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$ , etc. Leurs résultats permettent de confirmer l'hypothèse précédemment formulée par Chen et al. en 2003 : **le « rolling » est permis par la conformation « étendue-fermée » tandis que l'adhésion requérait la conformation « étendue-ouverte ».** Cela signifie qu'en présence du ligand, le dimère peut adopter deux conformations différentes. Ces conformations ne sont permises qu'avec le bon fonctionnement d'un site d'adhésion dépendant d'ions métalliques (**MIDAS**) et la **présence d'ions  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$** . Il existe donc une régulation bimodale par modification de sa géométrie : le domaine ADMIDAS (adjacent to MIDAS) agit comme un site régulateur négatif en fermant la conformation étendue, ce qui permet le *rolling* en limitant l'affinité pour le ligand ; le domaine SyMBS (*synergeistic metal ion binding site*) stabilise la conformation « étendue-ouverte », et donc l'adhésion ferme à l'endothélium (Chen et al., 2003).

L'étude a également permis de comprendre les mécanismes de changement de conformation en étudiant les interfaces de contact entre les différentes parties des intégrines. Ainsi, la boucle FG (FG loop en rose sur la figure) permet la transmission du changement de conformation du domaine « thigh » au domaine «  $\beta$ -propeller » de l'intégrine  $\alpha 4$ . Pour l'intégrine  $\beta 7$ , l'interface de contact entre le domaine hybride et le domaine  $\beta I$  est centrée autour d'une lysine (Lys-346). **Le ligand ne se lie pas à  $\alpha 4$  mais uniquement à  $\beta 7$  au niveau du SDL (*specificity determining loop*) et du domaine MIDAS.** Le site de liaison au ligand mesure environ 40 Å de long ce qui le rend plus profond que les sites de liaison au ligand des autres intégrines ( $\alpha IIb/\beta 3$  and  $\alpha V/\beta 3$ ).

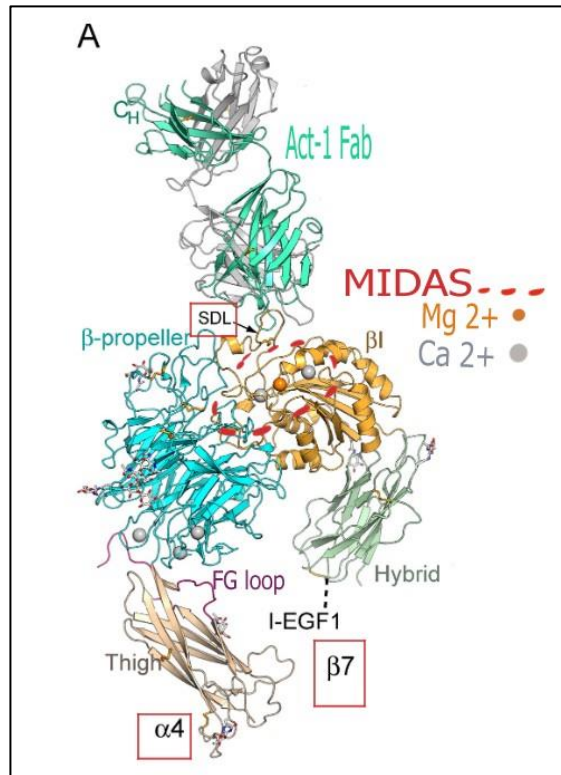


Figure 22 : structure quaternaire du complexe  $\alpha 4\beta 7$  (LPAM-1) et son ligand

(Yu et al., 2012) modifié par l'auteur

Comme vu précédemment, la mutation d'ITGB7 que nous étudions entraîne une diminution de l'affinité entre les chaînes  $\alpha 4$  et  $\beta 7$ . La présence de la glycine mutée très proche du domaine SDL et la modification de conformation qu'elle entraîne permet de faire l'hypothèse que l'affinité pour le ligand est également diminuée. **Si l'hétérodimère  $\alpha 4\beta 7$  reste en conformation « courbée-fermée », il ne peut pas y avoir de liaison non covalente avec MADCAM-1.** Sans cette liaison, le lymphocyte ne peut plus effectuer le « rolling » et ne peut plus adhérer à l'endothélium. **Ainsi, la diapédèse des lymphocytes T CD4 et CD8 et des éosinophiles n'est plus possible, et l'adressage au site final, soit la lamina propria soit l'épithélium intestinal n'a plus lieu. Or la présence de ces lymphocytes est nécessaire au fonctionnement de l'immunité adaptative intestinale** (voir paragraphe précédent). En effet, la présence des lymphocytes T CD8 cytotoxiques dans l'épithélium intestinal, au sein des villosités, induit l'apoptose des entérocytes contaminés par un agent pathogène. **Les IEL vont donc empêcher l'entrée et la propagation de ce pathogène dans l'organisme.** Les lymphocytes T CD4 vont, par la sécrétion de cytokines, contribuer à l'amplification clonale et à la différenciation des LTc (par IFN gamma), et LB (IL-2) spécifiques du pathogène. **En leur absence dans la lamina propria, la réponse adaptative n'est pas possible,** et si l'immunité innée n'est pas suffisante pour l'élimination du pathogène, la réponse est dépassée, avec un risque de diffusion systémique et de sepsis.



### 3- Conséquences physiopathologiques

Des études ont analysé les conséquences d'une absence ou d'une inhibition de l'expression du gène *Itgb7*, notamment au moyen de souris (*Mus musculus*) chez qui le gène est invalidé. Dans l'étude (Hao Sun et al., 2020), des souris déficitaires en interleukine 10 (*IL10* *-/-*) ont été utilisées car elles développent une iléite, c'est-à-dire une inflammation intestinale spontanée. Ces souris ont été accouplées avec des souris *Itgb7* *-/-*, pour obtenir des doubles mutants (*IL10* *-/ITGB7* *-*) à comparer aux souris ayant une iléite mais une intégrine  $\beta 7$  fonctionnelle (*ITGB7* *+/IL10* *-*). Chez certains animaux *ITGB7* *+/IL10* *-*, en dehors de toute infection, une **inflammation intestinale**, d'apparition spontanée vers 60 jours d'âge, avec une diarrhée sévère, des **saignements rectaux** conduit à une mortalité de 27%. Les souris *ITGB7* *-/IL10* *-* présentaient les mêmes symptômes mais exacerbés, avec une diminution drastique du poids et **jusqu'à 70 % de mortalité**. L'examen microscopique de la muqueuse intestinale en histologie montre également une différence entre les deux groupes : les souris *ITGB7* *-/IL10* *-* ont une désorganisation des cryptes plus marquée, une ulcération de la muqueuse plus sévère, et une infiltration plus intense de cellules immunitaires. L'inactivation de  $\beta 7$  entraîne une diminution du nombre de lymphocytes régulateurs (Treg) dans la lamina propria, notamment à hauteur du colon, sans perte de leurs fonctions : seule la localisation de ces lymphocytes est altérée.

Des résultats similaires ont été constatés chez des souris invalidées pour *Itgb7* : les souris ont une **hypoplasie du GALT, pas de développement des plaques de Peyer à six semaines d'âge, une augmentation significative de la charge de pathogènes, une diminution du nombre de LT CD4, de plasmocytes, et d'IEL**. Cependant la muqueuse intestinale de ces souris transgéniques reste étanche et continue (Wagner et al., 1996).

a : plaques de Peyer : hypoplasie et un follicule de moins sur la souris -/-

b : immunomarquage des plasmocytes à IgM dans les plaques de Peyer

c : immunomarquage des plasmocytes à IgA dans les villosités intestinales

d : immunomarquage des LTCD4 dans la lamina propria

e : immunomarquage des IELs CD8+ dans les villosités intestinales

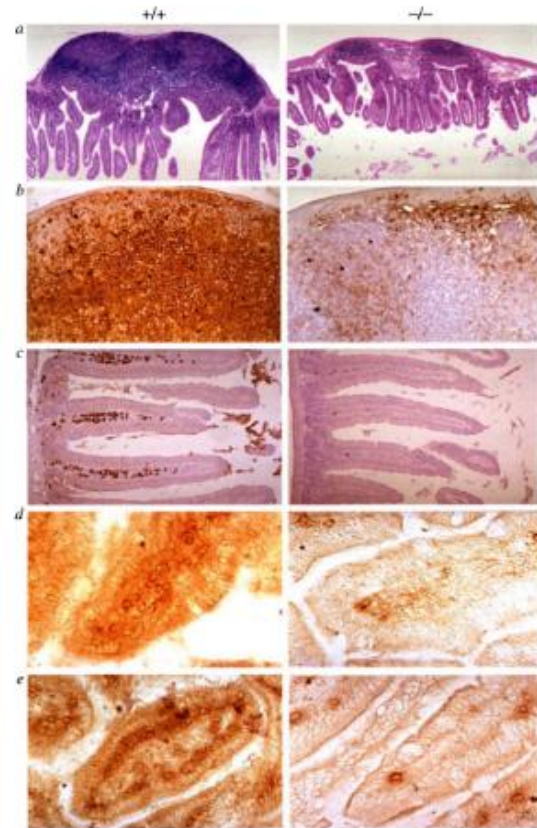


Figure 23 : coupes histologiques et immunohistochimiques de jéjunum de souris ITGB7+ à gauche et ITGB7 – à droite

(Wagner et al., 1996)

Le blocage de l'interaction entre l'intégrine  $\beta 7$  et MAdCAM-1 est une voie thérapeutique utilisée dans la maladie de Crohn en médecine humaine pour réduire l'inflammation intestinale (Rivera-Nieves et al., 2005). L'étude de Yu et al. mentionne une réduction de l'iléite chronique par l'utilisation d'anticorps monoclonaux qui bloquent l'interaction entre  $\beta 7$  et MAdCAM-1 (Yu et al., 2012).

On peut supposer que chez un individu sans inflammation chronique de l'intestin, la diminution de l'expression d'ITGB7 entrainera une augmentation des syndromes digestifs (diarrhée, entérite, prolapsus, etc.). Cependant chez les individus avec une iléite chronique, le blocage de l'interaction empêche l'afflux de lymphocytes à activité pro-inflammatoire sur le site, et diminue les symptômes associés à l'inflammation.

### III) Caractérisation clinique et biologique des conséquences de la mutation ponctuelle d'*ITGB7* dans l'espèce bovine

#### A) Cadre et objectif de l'étude

Les anomalies génétiques représentent un défi croissant chez les bovins laitiers de race Prim'Holstein. Depuis l'avènement de l'insémination artificielle, l'utilisation massive de la semence des taureaux stars a conduit à un appauvrissement de la diversité génétique de cette race en France et dans le monde. La réduction du nombre de géniteurs et de la diversité génétique a conduit à la naissance d'individus homozygotes à certains allèles, conduisant à l'expression de signes cliniques lorsqu'il s'agit d'un allèle muté récessif. Lorsque l'anomalie est défavorable du point de vue clinique ou zootechnique, elle a un impact financier pour les exploitations laitières qui hébergent des bovins atteints. Paradoxalement plus l'anomalie est difficile à détecter, lorsque les symptômes sont peu évocateurs, plus le coût engendré par l'anomalie sera élevé. En effet, un individu né avec une malformation sera rapidement détecté. Une fois la cause identifiée, il est possible de mettre en place rapidement des mesures d'éradication pour empêcher la propagation de l'allèle au sein de la race. En revanche, lorsque les signes cliniques sont frustrés, les échecs de traitements médicaux et l'entretien d'animaux peu ou non productifs sont à l'origine d'un coût non négligeable pour l'éleveur. De plus, sans identification de l'origine génétique, la propagation de l'allèle devient inévitable ce qui entraîne des coûts d'autant plus grands.

Face à cette problématique, l'INRAe a mis en place en 2016 un système de détection pour les mutations difficiles à repérer : il s'appuie sur la génétique inverse. Par l'analyse d'un grand nombre de données de génotypage, il est possible de repérer des allèles pour lesquels il existe un déficit en individus homozygotes. La mutation sur le gène *Itgb7*, responsable du BLIRD, fut identifiée de cette manière en 2019 par l'équipe d'Aurélien Capitan (ELIANCE-INRAe). La fréquence estimée du variant délétère est estimée à 4,8% dans la population bovine. Les données de survie ont été précisées pour *Itgb7* dans le cadre du mémoire d'Ana Guintard, étudiante à AgroCampusOuest en 2021. A partir des données récoltées dans le cadre du projet Morphée, dont l'objectif était de mesurer l'influence du génotype sur la mortalité des individus entre la naissance et la mise à la reproduction, le devenir de 411 738 femelles de race Prim'Holstein a été analysé, dont 92 966 cas (pères et grand-pères maternels porteurs de l'haplotype H5P25). Il en ressort que la courbe de survie des individus possiblement porteurs est modifiée, avec la mise en évidence d'une mortalité tardive. Cependant cette mortalité peut également être attribuée à de nombreuses réformes autour de 1000 jours de vie. Il reste à déterminer si ces réformes sont dues à un mauvais état de santé de l'animal ou à une faible valorisation économique. Depuis octobre 2019, cette anomalie est dépistée sur tous les animaux génotypés en France afin d'identifier les produits homozygotes.

La mutation d'*Itgb7* conduit à une mutation ponctuelle affectant une protéine transmembranaire présente chez tous les métazoaires : l'intégrine  $\beta 7$ . En se dimérisant avec  $\alpha 4$  ou  $\alpha E$ , elle forme un récepteur ayant de nombreuses fonctions dans l'organisme et notamment l'adressage des lymphocytes activés au GALT (tissu

lymphoïde associé à l'intestin). Cette anomalie n'a pas d'équivalent identifié en médecine humaine. En revanche, l'utilisation d'anticorps monoclonaux ciblant cette intégrine fait partie du traitement utilisé dans le traitement de la maladie de Crohn. La mutation est à l'origine d'une modification de sa structure tridimensionnelle au niveau du site de liaison avec la protéine partenaire, ce qui provoque une diminution prédite de leur affinité. L'adressage des lymphocytes T CD4 au GALT serait donc compromis.

L'objectif de cette étude est de caractériser la mutation ponctuelle d'ITGB7 en se basant sur la collecte de données épidémiologiques sur 86 bovins dont 40 homozygotes, 6 hétérozygotes et 40 individus non mutés porteurs de l'allèle sauvage. En déterminant le phénotype associé à cette anomalie, nous pourrions mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués, ainsi que la démarche à suivre pour son éradication.

## B) Matériel et méthodes

### 1-Recherche d'animaux candidats à l'étude de la mutation

Afin d'établir les mécanismes physiopathologiques associés à l'anomalie génétique ciblant la protéine ITGB7, des animaux porteurs de la mutation ont été examinés et prélevés de leur vivant. Le recrutement de ces individus avant leur mort prématurée a eu lieu au cours de deux phases : la première en juillet-août 2021 et la deuxième en mars-avril 2023. Pour toute la suite du manuscrit, l'âge indiqué animaux est celui du jour du prélèvement.

#### *a-Recrutement d'animaux vivants homozygotes pour la mutation ITGB7 à l'aide des données de génotypage*

Le recrutement d'animaux homozygotes pour la mutation d'*Itgb7* est réalisé à l'aide d'une collaboration entre INRAe et les organismes de sélection français. En effet, les données de génotypage des élevages engagés dans la sélection sont cédées à l'INRAe dans le cadre de projets de recherche. L'ADN est extrait à partir de biopsie de cartilage d'oreille obtenu au moment du bouclage de l'animal, réalisé dans le cadre de l'identification obligatoire systématique le jour de la naissance. Le coût du génotypage en France est d'environ 35 euros HT par bovin à ce jour. Il est également possible de génotyper les bovins plus tardivement lorsque les animaux atteignent l'âge de 3-4 mois à partir du cartilage auriculaire prélevé par un technicien, de sang total (tube EDTA) ou de poils.

Ce matériel génétique est ensuite analysé au moyen de puces génétiques Illumina Bovine SNP50, comportant environ 50.000 marqueurs SNP. Depuis octobre 2019, le variant candidat délétère T.G375S identifié au sein de l'haplotype est ajouté aux puces de génotypage de routine. Cela signifie que lors de la lecture de la puce les

individus homozygotes et hétérozygotes pour le variant sont identifiés et indexés comme tels dans les fichiers de génotypage.

Cette méthode a ainsi permis d'identifier les individus homozygotes et hétérozygotes pour l'haplotype de tous les bovins de la race Prim'Holstein qui sont génotypes et qui sont nés après juillet 2019 (3 mois avant l'ajout du variant sur la puce). Cette approche offre ainsi la possibilité de repérer des caractéristiques phénotypiques liées à un haplotype, sans avoir besoin de connaître précisément la mutation impliquée. L'ensemble des animaux recrutés pour cette étude ont été sélectionnés par cette méthode.

#### *b- Recrutement d'animaux hétérozygotes et témoins*

Les animaux témoins sont recrutés de la manière suivante : une fois l'individu homozygote choisi, les données de génotypage de tous les bovins de l'élevage sont examinées. Les bovins dont l'âge est le plus proche de celui de l'animal porteur de la mutation sont retenus pour l'étude. Pour sélectionner les témoins, il faut choisir un individu contemporain non porteur de la mutation pour chaque sujet homozygote. Cet individu témoin possède l'allèle non muté en deux exemplaires, et il est dit de génotype sauvage. Les animaux hétérozygotes sont également contemporains du sujet muté mais possède l'allèle muté en un seul exemplaire.

#### *c- Répartition des animaux faisant partie de l'étude*

La liste des animaux vivants porteurs de la mutation a été complétée avec les coordonnées et la localisation de l'élevage où se trouve l'animal. Les animaux recrutés pour l'étude sont choisis dans ce pool d'individus homozygotes initial. Pour des raisons logistiques, deux zones ont été ciblées : un rayon de 200 km autour de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) et le bassin laitier Sud Normand (lieu du domicile familial). A partir de la liste des coordonnées, l'éleveur propriétaire du bovin a été contacté afin d'expliquer brièvement le projet de recherche en cours et d'obtenir son accord pour une visite afin d'examiner l'animal concerné, comprenant un examen clinique et des prélèvements biologiques (script visible en annexe). Cet entretien téléphonique permet également d'éliminer les animaux morts des potentiels candidats depuis le génotypage et de faire une première évaluation de l'état de santé en fonction de l'historique médical. Le script du discours énoncé pour les entretiens téléphoniques est disponible en annexe. A chaque sujet homozygote muté est associé un individu homozygote sauvage contemporain provenant du même élevage.



*d-Prévalence estimée et répartition des animaux porteurs de la mutation dans le cheptel français*

A partir des listes de données de génotypage, il est possible d'évaluer la prévalence de l'anomalie *Itgb7* dans les différents départements français à une période fixe. Les données utilisées ont été extraites en octobre 2022 en utilisant les données de génotypage de la France entière. Ainsi, 314 animaux homozygotes pour le variant ont été identifiés sur l'ensemble des bovins de race Prim'Holstein génotypés. Logiquement, les bassins laitiers intensifs abritant le plus de bovins Prim'Holstein présentent des prévalences de l'anomalie les plus élevées. Le troisième quartile des départements les plus peuplés en animaux homozygotes mutés (>10 individus) comprend : le Bas-Rhin, le Morbihan, la Mayenne, la Manche, la Loire-Atlantique, l'Ille-et-Vilaine, le Finistère, les Côtes-d'Armor et le Calvados.

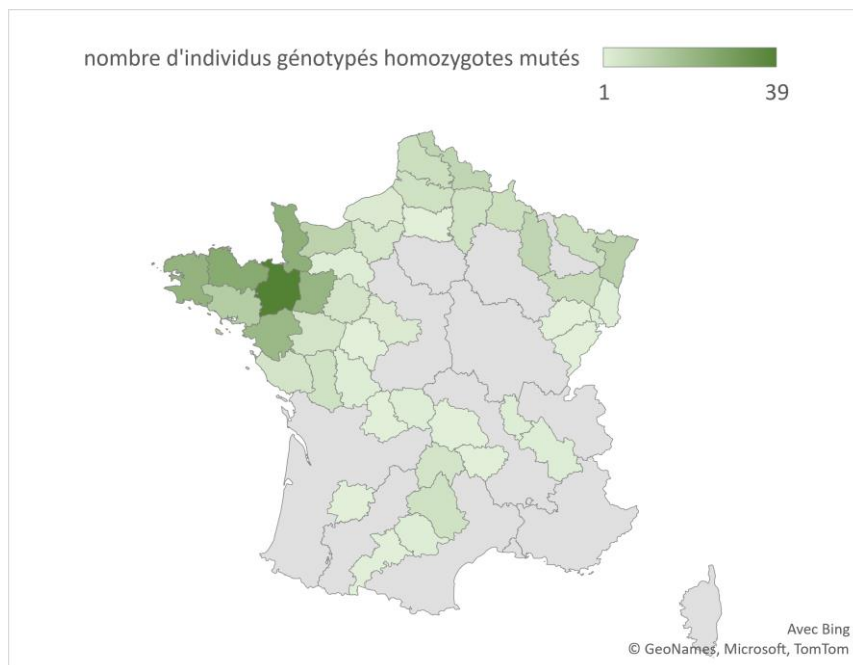


Figure 24 : Cartographie de l'anomalie ITGB7 dans la race Prim'Holstein fin octobre 2022

Réalisé par l'auteur à l'aide de données personnelles sur le logiciel Excel

Pour évaluer la prévalence de l'anomalie au sein du cheptel bovin Holstein français, seule la population génotypée pour laquelle les informations sur le statut à la mutation sont disponibles a été utilisée. A partir des données de génotypage des départements de la Manche et de l'Orne générées en août 2021, pour 6096 animaux génotypés, 661 sont hétérozygotes et 18 sont homozygotes pour la mutation *Itgb7*. En pourcentage, cela signifie que 10,8% des vaches génotypées sont hétérozygotes et seulement 0,3 % sont homozygotes.

Ce résultat est conforme au nombre d'hétérozygotes attendus pour une fréquence de l'allèle muté de **4,8%**. Cette fréquence a été calculée en 2020 par l'équipe d'Aurélien Capitan après incorporation du variant identifié sur les puces de

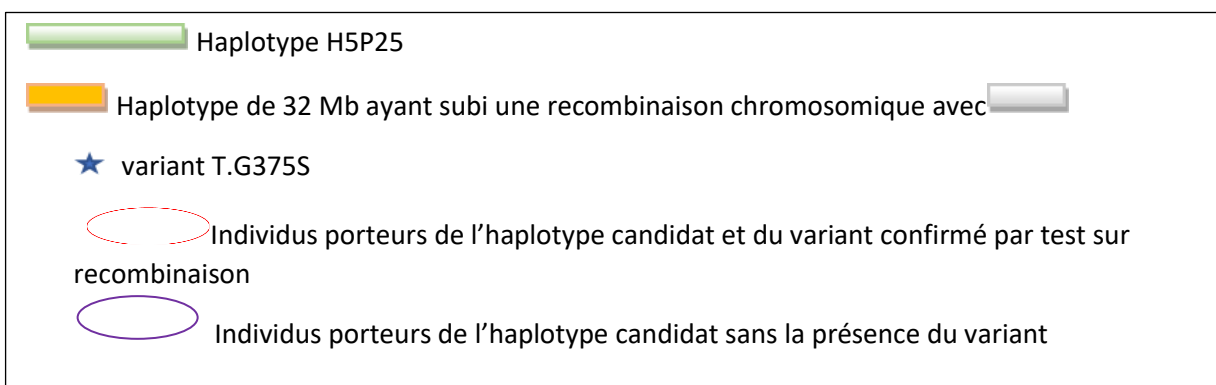
génotypage (euroGM d'Illumina®). Sur 193 200 bovins génotypés en routine dans toute la France, la fréquence allélique F du variant est calculée à l'aide de la formule :

$$F = \frac{\text{nombre d'occurrence de l'allèle muté}}{\text{nombre total d'allèle dans la population}} = \frac{\text{nbhtz} + 2 \cdot \text{nbhmz}}{2(\text{nbhtz} + \text{nbhmz} + \text{nbnonporteurs})}$$

avec nbhtz le nombre d'individus hétérozygotes à l'anomalie, nbhmz le nombre d'individus homozygotes à l'anomalie et nbnonporteurs le nombre d'individus non porteurs de l'anomalie.

#### e. Etude par généalogie de l'apparition historique de la mutation

Pour retracer l'évolution d'une anomalie génétique et comprendre sa propagation à travers une population animale, il faut déterminer le moment et l'individu où la mutation *de novo* est apparue. Les taureaux utilisés dans les schémas de sélection génétique et répertoriés dans les catalogues d'insémination sont tous génotypés et le génome de nombre d'entre eux est séquencé ou imputé. L'haplotype H5P25 est relativement fréquent dans la population bovine. En recherchant le variant délétère identifié dans la séquence de tous les males porteurs de l'haplotype, on identifie les animaux descendants du premier porteur de la mutation. En remontant la généalogie de ces taureaux grâce aux fichiers familiaux, il est possible de mettre en évidence la présence d'ancêtres communs. Il faut donc identifier l'ancêtre commun le plus ancien porteur du variant et de l'haplotype, et dont le père n'est pas porteur du variant. Cet ancêtre commun est le taureau ELTON né en 1983. Ce taureau canadien de race Prim'Holstein de haute valeur génétique a diffusé énormément en Amérique du Nord. Le patrimoine génétique exceptionnel de son fils O-MAN a été exporté à l'international jusqu'en Europe, et notamment en France. Les taureaux actuels nés en France porteurs du variant sont quasiment exclusivement des descendants d'O-MAN. C'est également chez le taureau O-MAN qu'une recombinaison chromosomique s'est produite entre le chromosome 5 et le chromosome 8. Cet événement génétique a permis la création d'un test de contrôle appelé « test sur recombinant » permettant la vérification de la présence du variant chez les individus génotypés mais non séquencés. En effet les individus testés possédant l'haplotype candidat et l'haplotype issu du chromosome 8 sur le chromosome 5 ont également une probabilité très forte de posséder le variant.





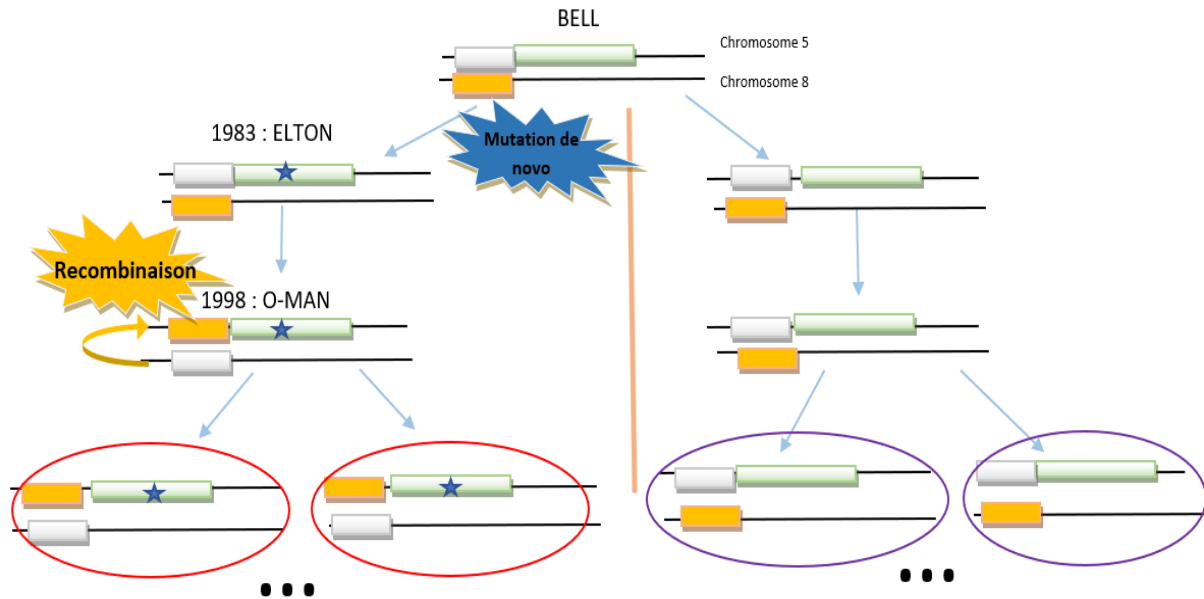


Figure 25 : Schéma simplifié retraçant les événements génétiques liés à la mutation sur le gène *ITGB7* dans l'espèce bovine

Diagramme réalisé par l'auteur

## 2-Collecte et enregistrement des données

### *a-Matériel utilisé lors des visites*

Afin de procéder à l'examen clinique et aux prélèvements divers matériels ont été utilisés sur site. Voici une liste des différents éléments requis pour opérer selon les normes d'hygiène et de biosécurité :

- Appareil photo
- Cotte/ Bottes propres, désinfectés avant l'entrée dans l'élevage
- Pour la réalisation des prélèvements biologiques :
  - Gants jetables en latex
  - Gants de fouille
  - Pots en plastique stérile (couvercle rouge)
  - Pour la désinfection de la zone de ponction : papier essuie-tout, alcool 70° en spray
  - Vacutainer®
  - Aiguilles jetables
  - Tubes de prélèvement sanguin : tubes EDTA, tubes héparinés, tubes secs
  - Marqueur noir indélébile
- Pour le transport des prélèvements biologiques
  - Caisse de transport
  - Glacière et pains de glace
  - Portoir pour tubes de prélèvement sanguin
- Pour l'examen clinique :
  - Stéthoscope

- Thermomètre pour grands animaux
- Ruban barymétrique, aussi appelé ruban de Crevat

### *b- Examen clinique*

La visite en élevage des sujets de l'étude se déroule selon un protocole standardisé et reproductible. Les mesures et prélèvements sont effectués par deux opérateurs, l'auteur et Lucie-Marie Dutheil, vétérinaire diplômée de l'ENVT, dans le cadre du projet de recherche.

Premièrement, l'éleveur fournit des informations complémentaires sur le bovin atteint notamment sur le type de logement et son alimentation. Ensuite, une photographie recto/verso du Document d'Accompagnement du Bovin (DAB) aussi appelé passeport avec carte verte, ainsi qu'une photo du cahier sanitaire est réalisée. Deuxièmement, après avoir assuré une contention de l'animal, un examen clinique général est effectué en deux étapes :

1/ Examen à distance : appréciation de la taille, de l'état d'engraissement, du pelage, de l'attitude et de l'état de vigilance

2/ Examen rapproché : prise de la température rectale, évaluation non exhaustive de l'abdomen et de l'appareil digestif (auscultation des quadrants, consistance de la bouse), de l'appareil respiratoire (fréquence respiratoire, auscultation pulmonaire) et cardio-vasculaire (fréquence cardiaque, couleur des muqueuses oculaires et buccales, position du globe)

Enfin, une estimation du poids de l'animal est réalisée à l'aide du ruban barymétrique en prenant la mesure du périmètre thoracique. Le positionnement du ruban est réalisé de manière systématique en plaquant le ruban autour du poitrail derrière le coude et le garrot. La mesure en cm et la conversion en poids selon ce ruban sont notées pour chaque animal.



Figure 26 : Positionnement du ruban barymétrique pour l'évaluation du poids d'un bovin

*schéma réalisé par l'auteur*

### *c-Photographie*

A des fins d'illustration, une photographie standardisée est réalisée : l'animal porteur homozygote de la mutation est debout sur ses aplombs, accolé à l'animal contemporain sauvage. Une contention au cornadis est idéale pour le placement. La photographie est prise de derrière par un opérateur debout, droit, dans l'alignement des pointes de l'ischium des animaux. L'appareil photo est à hauteur du regard de l'opérateur. La partie postérieure de l'animal doit être visible entièrement du haut du dos jusqu'aux sabots.

### *d-Prélèvements biologiques*

Une fois l'examen clinique réalisé, l'opérateur entreprend le prélèvement d'échantillons biologiques. Des bouses fraîches sont collectées à l'aide d'un gant de fouille par voie rectale et placées dans un pot en plastique étanche. Puis, la zone de prélèvement sanguin veineux en regard de la veine jugulaire est désinfectée à l'aide d'un papier absorbant imprégné d'alcool à 70°. Le sang est prélevé par ponction, à l'aide d'une aiguille montée sur un Vacutainer®. Le prélèvement sanguin veineux comporte de 3 à 4 tubes (1 tube sec 5mL, 1 ou 2 tubes héparine 10mL, 1 tube EDTA (Ethylène Diamine Tétra-Acétique) 10mL ou 1 tube EDTA 5 mL). Les tubes avec anticoagulant sont retournés trois fois pour être homogénéisés afin d'assurer un traitement uniforme.

Tous les échantillons sont annotés du numéro de travail du bovin et du nom de l'élevage

## 3-Examens de laboratoire

L'ensemble des prélèvements biologiques est transféré au laboratoire d'immunologie de l'ENVT (UMR IHAP INRAE-ENVT) afin d'être conservés dans des conditions optimales avant leur utilisation ultérieure.

Le tube de sang EDTA est analysé immédiatement dès réception au laboratoire. Le reste de l'échantillon de sang total et les tubes de sang prélevé sur tube sec et héparine sont centrifugés à 3000 tours par minute afin de récupérer sérum et plasma pour être ensuite aliquotés, identifiés et congelés à -70°C. Les fèces ont également stockés dans les mêmes conditions.

### *a-Hémogramme*

Les échantillons de sang ont été transférés au laboratoire d'analyses médicales de l'ENVT. L'analyse est réalisée avec un automate d'hématologie sur le principe de la cytométrie en flux. L'analyseur dénombre les différents types de cellules sanguines

dont les érythrocytes, les leucocytes (dont les lymphocytes, les monocytes, les granulocytes polynucléaires neutrophiles, éosinophiles, et basophiles) et les thrombocytes. Une formule a été établie après énumération des différents types sur un étalement sanguin coloré au préalable au MGG. Un comptage des band-cells permet d'orienter sur une possible inflammation. Cette analyse quantitative est une numération et formule sanguines (NFS), avec divers autres paramètres calculés. L'automate fournit également l'hématocrite (mHt) de l'échantillon.

### *b-Cytométrie en flux*

La cytométrie en flux est une technique d'analyse permettant de décrire des populations cellulaires de manière plus spécifique que peut le faire un automate d'hématologie. Le principe de base de cette analyse repose sur la mesure de la dispersion de la lumière et de la fluorescence émise par les cellules lorsqu'elles traversent un faisceau laser (Verschoor et al., 2015). On ajoute à l'échantillon des anticorps fluorescents, qui se lient spécifiquement à des molécules particulières d'un type cellulaire donné. Ainsi, il est possible de connaître exactement le type de cellules présentes dans l'échantillon et d'en connaître la proportion. Dans notre étude, on cherche à vérifier l'hypothèse formulée au départ : « Chez les porteurs de la mutation de l'intégrine  $\beta 7$ , les lymphocytes T CD4 (et éventuellement T CD8) sont-ils en nombre réduit dans GALT par défaut d'adressage ». Les lymphocytes T CD4 et T CD8 sont alors marqués par des anticorps spécifique. L'appareil peut alors lire l'échantillon de chaque individu et en sortir une représentation graphique à deux dimensions où chaque cellule est représentée par un point qui se distribue en fonction du type et de l'intensité de fluorescence qu'elle émet.

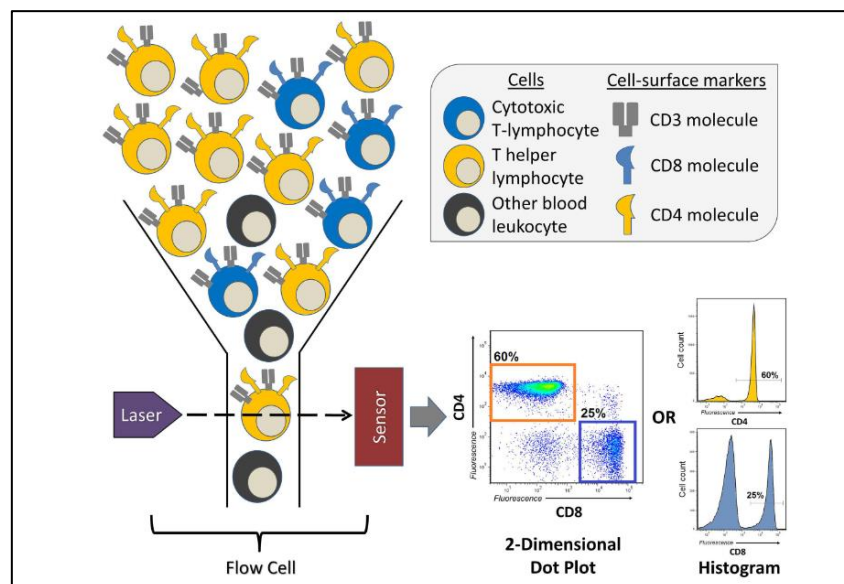
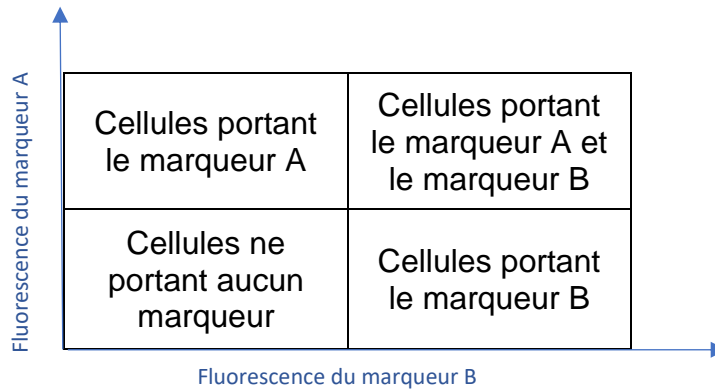


Figure 27 : Schéma simplifié du fonctionnement d'un cytométrie en flux avec des fluorochromes spécifiques des lymphocytes TCD4 et TCD8

(Verschoor et al., 2015)

Le Dot Plot en deux dimensions se lit de la manière suivante :



Le protocole de préparation de l'échantillon avant analyse avec l'automate est le suivant :

- 1) dilution du sang total (tube EDTA)
- 2) dépôt sur un gradient de sucrose afin de créer un milieu séparant les cellules polynucléées et les globules rouges des cellules mononucléées (dont les lymphocytes)
- 3) centrifugation
- 4) Récupération de l'anneau de cellules à la surface du gradient qui contient la fraction de cellules mononucléées

*En cas de présence de quelques érythrocytes, les lyser en ajoutant 1mL d'ACK (Acide Citrique-K Citrate) pendant 30 secondes-1 minute*

- 5) Centrifugation du surnageant
- 6) Ajout de 15 ml de solution tampon
- 7) Passage au filtre 0,4 microns de la suspension obtenue pour l'élimination des agrégats et fantômes cellulaires
- 8) Centrifugation et élimination du surnageant
- 9) Diluer en ajoutant du sérum physiologique pour obtenir 5 mL de solution

Après isolement des cellules mononucléées du sang, la concentration des cellules est déterminée par une première analyse avec le cytomètre. L'appareil est réglé selon le critère taille granulosité ce qui permet d'exclure du comptage les agrégats de cellules polynucléées restantes (=bruit). Ensuite, la solution est mélangée aux fluorochromes suivants :

- o Marqueur de viabilité : exclure les cellules mortes (résultat positif)
- o Marqueur Anticorps (Ac) CD45 : spécifique des leucocytes, *permet d'exclure les globules rouges restants*
- o Marqueur Ac CD3 : spécifique des lymphocytes T (LT)
- o Marqueur Ac CD4 : spécifique des LTCD4+

o Marqueur Ac CD45R0 : spécifique des LT déjà activés mémoire

- Marqueur Ac spécifique des intégrines  $\alpha 4$  et  $\beta 7$

Selon la fluorescence émise par les cellules traversant le faisceau, le cytomètre peut alors déterminer quels marqueurs se sont liés spécifiquement à la cellule. La lecture du résultat permet alors de savoir exactement la répartition des types cellulaires dans l'échantillon.

## C) Résultats

### 1- Description clinique

*$\alpha$ -Animaux candidats recrutés dans l'enquête terrain*

Après application des critères de recherche décrits dans la partie « B)1)c » nous obtenons :

- 40 animaux homozygotes mutés :
  - 13 individus homozygotes dans la cohorte Sud-Ouest dont : 8 dans le département de l'Aveyron, 2 dans le Tarn, 1 dans le Lot-et-Garonne, 1 en Haute-Garonne et 1 dans les Pyrénées-Atlantiques. Six bovins proviennent de la première vague de recrutement et six de la seconde.
  - 27 individus homozygotes dans la cohorte Sud-Normandie dont : 11 en Ille-et-Vilaine, 8 dans la Manche, 7 en Mayenne et 1 dans l'Orne. L'ensemble de ces individus provient de la deuxième vague de recrutement.
- 39 animaux homozygotes sauvages
- 7 animaux hétérozygotes mutés contemporains issus des mêmes élevages

A partir de ces animaux, on obtient 24 binômes homozygotes mutés-sauvages appariés intra-élevage ayant un écart d'âge inférieur à 1 mois.



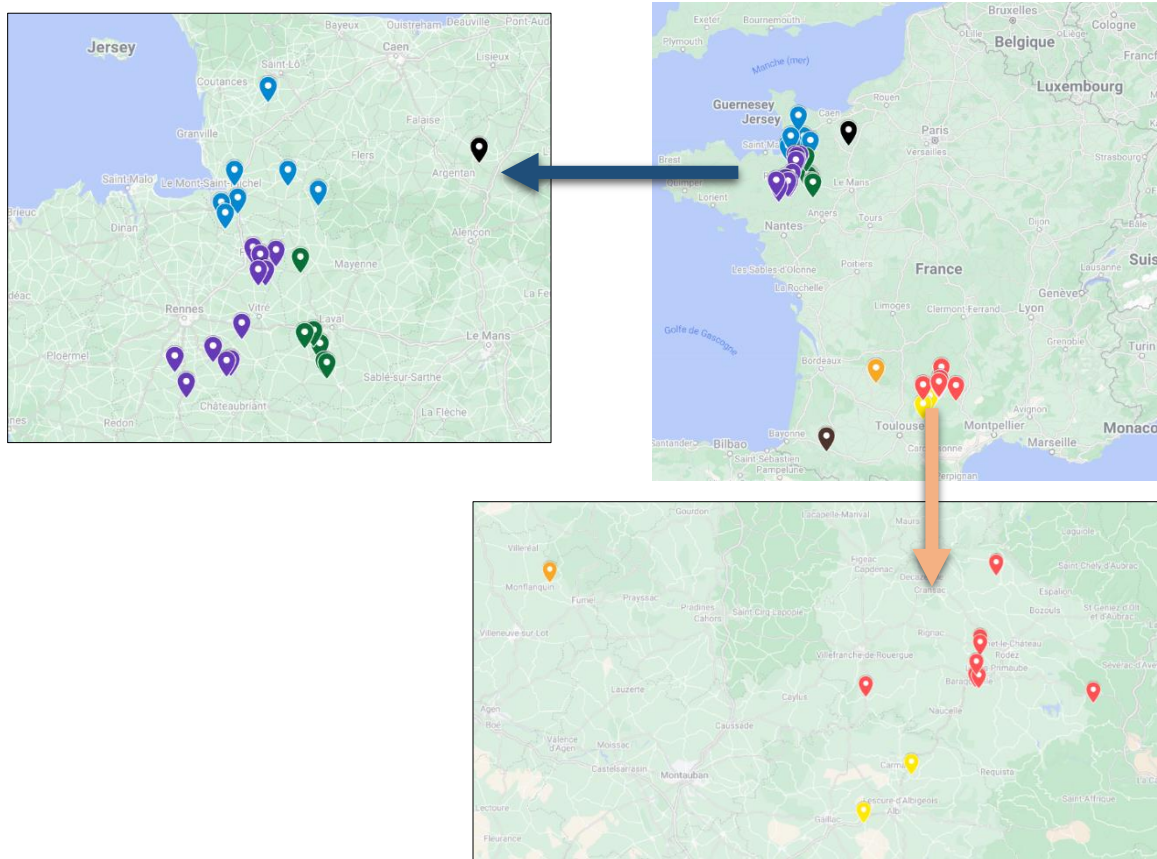


Figure 28 : Répartition géographique des élevages recrutés dans l'étude, zoom sur les cohortes Sud-Normandie et Sud-Ouest

Réalisé par l'auteur à l'aide de données personnelles sur le logiciel « Mymaps »

Tous les sujets de l'étude sont des bovins femelles de race pure Prim'Holstein d'un âge au jour du prélèvement compris entre 90 et 1075 jours.

#### i) Description phénotypique, aspect macroscopique

Les examens cliniques et les observations réalisées dans les élevages ont permis de faire une description phénotypique des animaux porteurs homozygotes de la mutation ITGB7 :

Le signe principal observé est un **retard de croissance** :

Sur 39 animaux porteurs homozygotes examinés, 15 sont ostensiblement plus petits que leurs contemporains sauvages, ce qui correspond à 38% de l'effectif total. La plupart de ces génisses ont quitté le lot d'élevage de leur cohorte de naissance car elles ont le gabarit de génisses plus jeunes de plusieurs mois, faisant dire aux éleveurs dit qu'elles « redoublent de lot ». Les 24 restantes ne présentent aucune différence phénotypique visible avec leurs contemporaines sauvages. Ces 15 animaux présentent également les caractères suivants :



- ⇒ Des proportions physiologiques homogènes
- ⇒ Une hauteur au niveau de la queue diminuée d'environ 10 cm

10 d'entre elles présentent en plus :

- ⇒ Un abdomen gonflé
- ⇒ Une modification de l'aspect du pelage, le poil est dit « sale » ou « piqué »

Quatre d'entre elles ont une cachexie marquée.



Figure 29 : Exemples les plus pertinents parmi les photographies réalisées

Source : données personnelles

photographie de la génisse avec l'atteinte la plus sévère  
(n° 1578) 200 kg à 617 jours de vie



## ii) Historique sanitaire

**Aucun des 39 animaux homozygotes n'a connu d'épisode morbide particulier à titre individuel.** Au cours de nos visites, aucun individu homozygote ne montrait de signes de diarrhée. L'appétit des animaux homozygotes ne semble pas différent de celui des autres animaux du même lot, même si cette appréciation est subjective.

La plupart des groupes ont reçu des traitements préventifs. Les traitements préventifs les plus fréquemment cités par les éleveurs sont les vaccins à valence respiratoire, les vermifuges et les anticoccidiens. Plusieurs épisodes d'atteinte respiratoire, notamment avec de la toux, ont été signalés mais ils concernaient l'ensemble du lot.

## iii) Poids des animaux en fonction de l'âge et selon le statut à la mutation

A la suite de l'enquête terrain, pour chaque individu nous disposons de l'âge (en jours) au moment du prélèvement et du périmètre thoracique (en cm). De même, pour chaque animal le statut à la mutation est connu. A partir de la mesure du périmètre thoracique en cm, le poids de l'animal a été estimé de trois manières différentes :

- Le poids lisible directement au verso du ruban de Crevat pour ce périmètre ; noté « POIDS indiqué par le ruban »
- Le poids calculé à l'aide de la formule de Crevat :  $P = K \times T^3$  (avec K un coefficient dépendant de l'âge et de l'état d'engraissement des animaux ici on a pris  $K= 80$  : noté « POIDS calculé avec la formule de Crevat »
- Le poids correspondant au périmètre selon un tableau de conversion adapté pour les bovins de race Prim'Holstein ; noté « POIDS converti selon tableau PH »

La tableau utilisé pour la conversion est visible en annexe.

Ces trois estimations de poids permettent d'obtenir des résultats semblables pour l'élaboration d'une courbe de croissance (poids de l'individu en fonction de l'âge).

Le graphique ci-dessous présente l'estimation du poids (« POIDS converti selon tableau PH ») à partir de la conversion du périmètre thoracique à l'aide du tableau en annexe des 86 bovins de l'ensemble de l'étude terrain en fonction de l'âge selon le statut à la mutation :

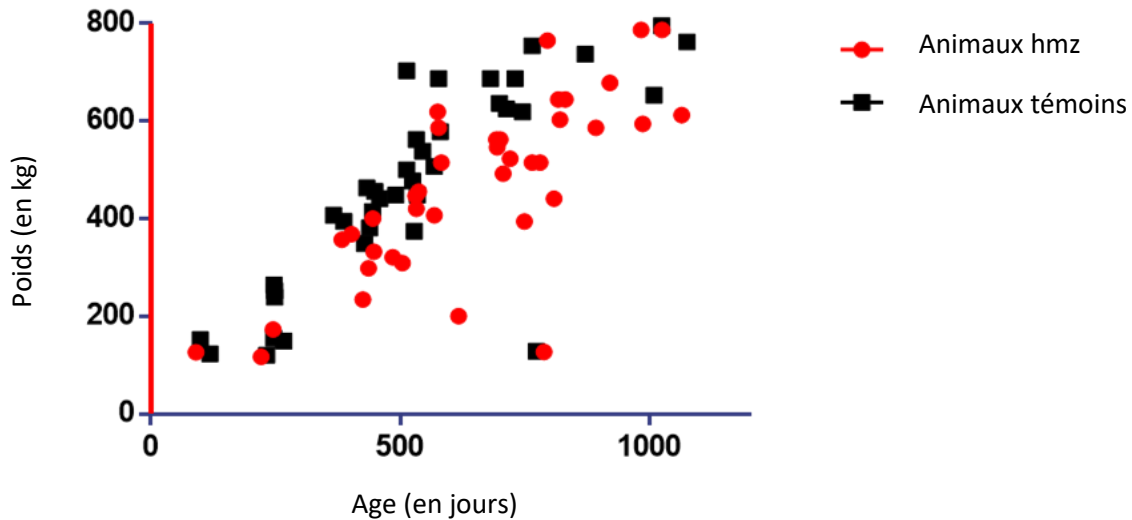


Figure 30: Poids des individus de l'enquête terrain en fonction de l'âge selon leur statut à la mutation

(Données personnelles)

La représentation graphique du poids des bovins montre deux nuages de points plus ou moins distincts (rouge pour le groupe des homozygotes et noir pour le groupe des témoins). Une tendance apparaît selon laquelle **les animaux porteurs homozygotes de l'anomalie génétique ont des poids inférieurs aux animaux porteurs homozygotes de l'allèle sauvage et ce quel que soit l'âge au moment de la mesure.**

La régression linéaire obtenue ne suivant pas une loi normale, un test de student ne peut être réalisé afin de vérifier la significativité des résultats. Un test de Mann Whitney a alors été réalisé et l'écart entre les deux groupes homozygotes et contrôles est statistiquement significatif. Il en résulte une p-value inférieure à  $10^{-5}$ .

#### a- Suivi clinique de trois animaux hospitalisés à l'ENVV

En vue de réaliser des examens cliniques exhaustifs, et un prélèvement de tissus digestif pour poursuivre la caractérisation dans le cadre du projet WELCOW ; trois animaux homozygotes pour le variant ont été hospitalisés à la clinique des ruminants de l'ENVV. Leur hospitalisation permettait également un examen clinique plus complet et répété, et la possibilité de détecter une dégradation de l'état clinique et/ou l'apparition de symptômes jusqu'ici non identifiés dans les élevages. Deux des trois animaux sont issus de l'enquête terrain réalisée à l'été 2021 et un de l'enquête terrain d'avril 2023 dans la cohorte sud-ouest.

N° de travail	Date de naissance	Date d'entrée à l'ENVT	Date d'autopsie	Symptômes observés au cours de l'hospitalisation	Mesure de poids à l'entrée
FR1220110827	20/11/2020	02/05/2022	22/03/2023	Aucun	330 kg
FR8160120021	12/12/2020	21/03/2023	11/04/2023	Aucun	450 kg
FR8160352012	12/11/2021	30/03/2023	11/04/2023	Aucun	301 kg

Tableau 4 : Récapitulatif des entrées et sortie des animaux hospitalisés à l'ENVT

A l'hospitalisation des trois animaux, **aucune anomalie à l'examen clinique n'a été notée, hormis leur faible développement corporel à l'arrivée.**

#### b- Suivi zootechnique des animaux du Pin (UE INRAE)

L'unité expérimentale INRAE du Pin-au-haras, située dans l'Orne possède un élevage laitier et a hébergé plusieurs animaux porteurs de la mutation à l'état homozygote. Dans ce cadre, les données de 655 génisses Prim'Holstein parmi lesquelles plusieurs cas étaient disponibles pour une analyse en fonction du génotype Itgb7 :

- Le poids mesuré mensuellement par pesée à l'aide d'une balance numérique sur les deux premières années de vie
- Les évènements sanitaires enregistrées sur les cahiers sanitaires
- Les causes de réforme ou les motifs de sortie

A partir des données de génotypage, quatre animaux homozygotes mutés et 106 individus hétérozygotes pour le variant ont été identifiés en juin 2022. Le poids mesuré de tous les animaux hébergés à la ferme expérimentale a été relié au statut à la mutation. Cette analyse permet d'obtenir les courbes de poids au cours du temps chez les trois catégories d'animaux : porteurs hétérozygotes, porteurs homozygotes et non porteurs.

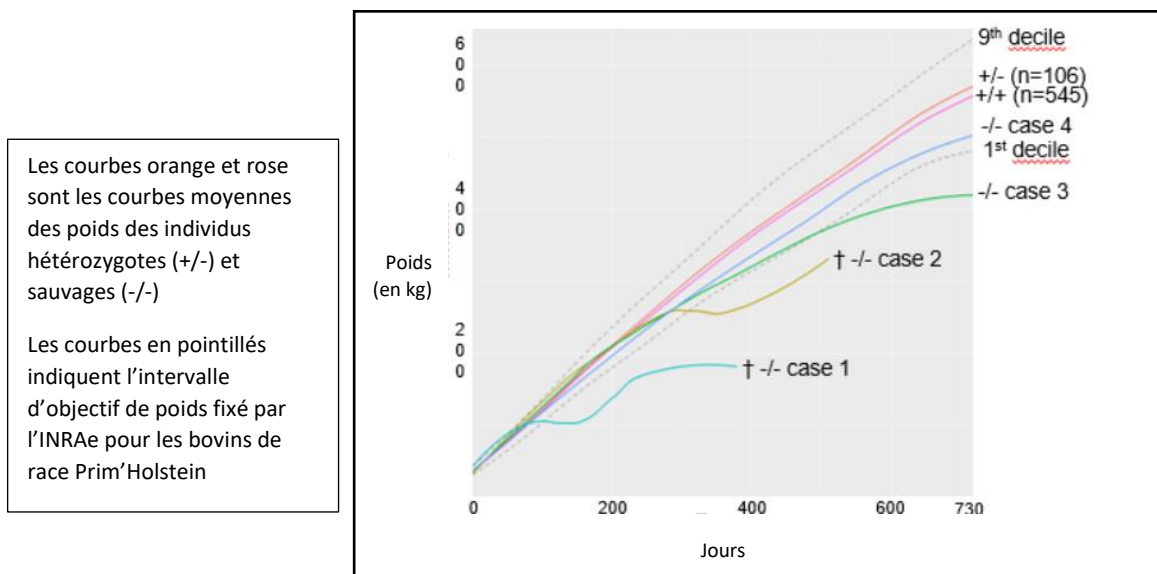


Figure 31 : Etude rétrospective des courbes de poids sur les deux premières années de vie de 655 animaux ayant logés à la ferme du Pin-au-haras



La figure 31 ci-dessus représente l'évolution du poids au cours des deux premières années de vie en fonction du statut à la mutation de 655 génisses suivie à la ferme expérimentale du Pin-aux-Haras. Le poids de chaque animal homozygote pour le variant est représenté par une courbe unique suivie de la mention -/- puis « case 1 », « case 2 », « case 3 » et « case 4 ». Trois homozygotes pour le variant sur quatre ont une courbe qui est en permanence en dessous de l'intervalle bas des objectifs de croissance fixés pour la race Prim'Holstein sur les deux premières années de vie. Les cas 1 et 2 sont morts prématurément : à respectivement 379 (12 mois) et 511 (17 mois) jours de vie. Les individus hétérozygotes présentent une courbe de croissance très similaire aux animaux de génotype sauvage, ce qui abonde dans le sens de l'absence d'un effet de ce variant lorsqu'il est présent en un seul exemplaire : il est dit récessif.

Les causes de sortie de ces animaux permettent d'obtenir les informations suivantes :

- le cas 1 est une génisse ayant présenté un retard de croissance très marqué et un très mauvais état général tout au long de sa vie : cachexie et poil piqué.
- Le cas 2 est une génisse ayant présenté une petite taille sans altération de l'état clinique et qui est morte sans prodromes.
- Le cas 3 est elle aussi morte prématurément vers 850 jours (donnée non précise). Sa mort ayant eu lieu après la date de production du graphique, les données n'ont pas été mises à jour. Cet animal sans retard de croissance marqué a présenté des symptômes évocateurs d'une atteinte nerveuse (marche en cercle, poussée au mur) une semaine avant mort sans qu'un examen vétérinaire ait pu être réalisé. L'autopsie n'a pas permis de conclure sur l'affection sous-jacente et la cause de la mort.
- Le cas 4 est, au moment de la réalisation du graphique, encore en vie à 730 jours d'âge.

## 2- Données paracliniques

### *a-Hémogramme*

#### i- Comparaison des différentes populations leucocytaires entre les individus porteurs et non porteurs

Un hémogramme a été réalisé chez 86 vaches (40 homozygotes porteuses et 46 non porteuses soit hétérozygotes et homozygotes sauvages). On note une leucocytose marquée chez les bovins homozygotes porteurs. En effet, la concentration sanguine moyenne en leucocytes, désignée WBC pour White Blood Cells) est de  $15,8 \pm 3,8 \times 10^9$  cel/L chez les mutés contre  $10,0 \pm 2,2 \times 10^9$  cel/L chez les sauvages. Cette leucocytose d'un facteur 1,6 est significative avec un test de Mann-Whitney, par lequel on obtient une valeur de p de  $3,8 \times 10^{-12}$ , soit inférieure à  $10^{-5}$ . La représentation graphique en « box-plot » ci-dessous présente les concentrations leucocytaires des deux groupes de bovins (porteurs hmz et non porteurs témoins).

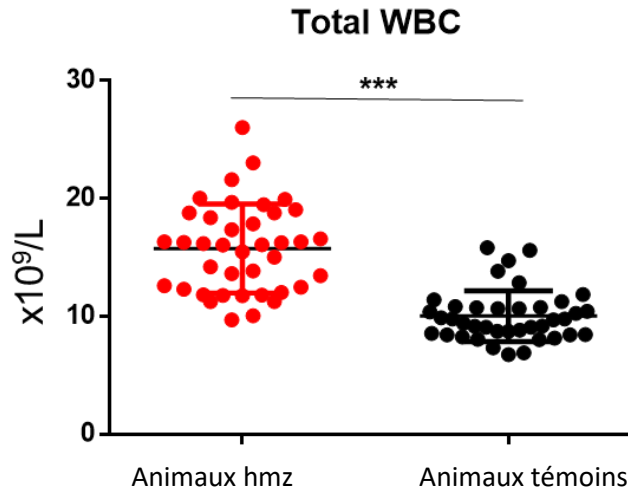


Figure 32 : Comparaison des concentrations leucocytaire sanguine en fonction du statut à la mutation

La leucocytose observée est due à l'augmentation du nombre de deux populations différentes : les lymphocytes, et plus marginalement les éosinophiles. La représentation graphique à la figure 33 ci-dessous présente la comparaison de ces différentes populations chez les deux groupes de bovins. Pour la population lymphocytaire, elle est augmentée de manière significative chez le groupe des animaux homozygotes :  $8,2 \pm 2,4 \times 10^9$  cel/L contre  $5,1 \pm 1,6 \times 10^9$  cel/L chez les individus de génotype sauvage. Un test de Mann-Whitney a permis d'obtenir une p-value significative inférieure à  $10^{-5}$ .

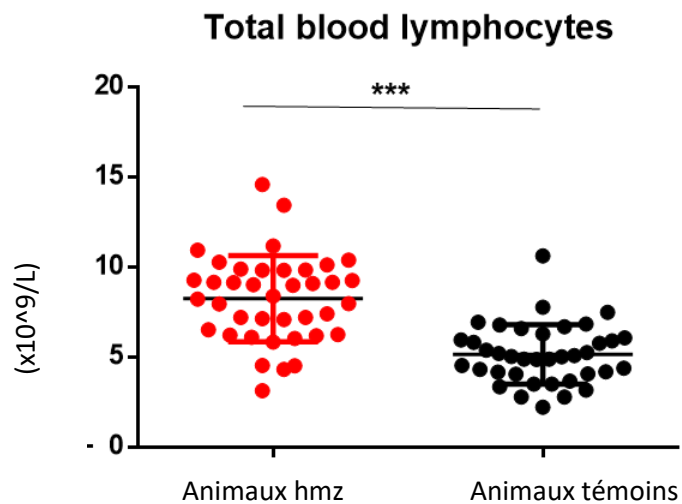


Figure 33 : Comparaison des concentrations lymphocytaires sanguine en fonction du statut à la mutation

Dans l'étude de la première cohorte 2021, sur **7 individus**, un hémogramme plus complet avait été réalisé. On constate que la population des **éosinophiles** est également augmentée de manière significative chez les homozygotes ( $q=0,001$ )

Les autres populations leucocytaires (basophiles, neutrophiles et monocytes) ne présentent pas de différence notable entre les deux groupes. De même, la numération et les caractéristiques des érythrocytes ne sont pas modifiées.



La leucocytose observée, et notamment la lymphocytose et l'éosinophilie, corroborent avec notre hypothèse de départ. En effet **l'augmentation de la concentration des lymphocytes et des éosinophiles dans le compartiment sanguin est une conséquence possible de leur incapacité à migrer vers le GALT**. La mutation de l'intégrine  $\beta 7$  est l'explication la plus plausible de ce défaut d'adressage. On parle alors de rétention dans le compartiment sanguin ou « blood trapping ».

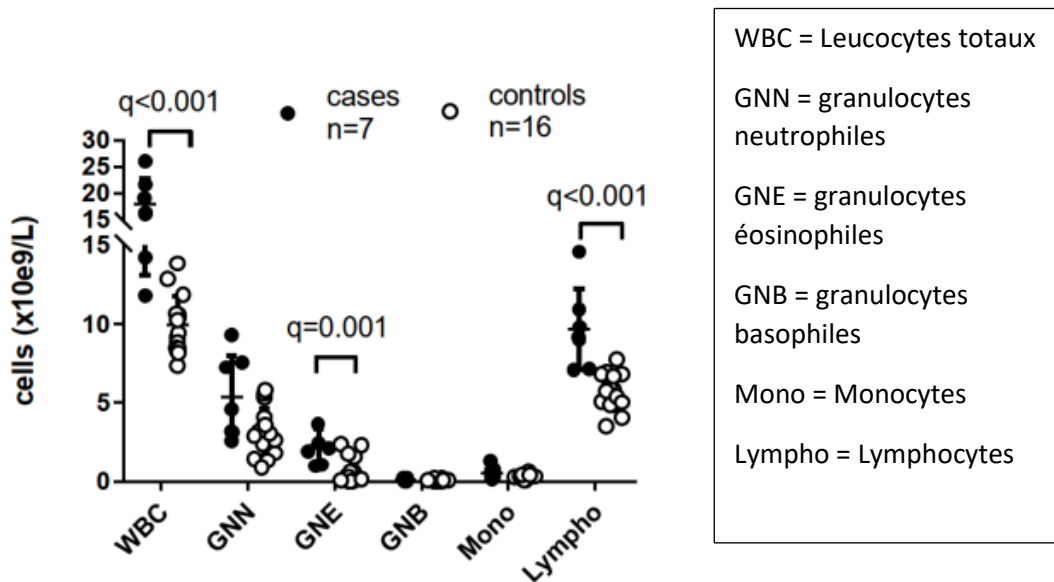


Figure 34 : Comparaison des concentrations leucocytaires sanguines en fonction du statut à la mutation chez sept individus de la cohorte 2021

ii- Concentration en leucocytes en fonction de l'âge selon le statut à la mutation

Le graphique ci-dessous présente la concentration sanguine des leucocytes, désignés WBC (pour White Blood Cells), en fonction de l'âge des animaux au jour du prélèvement et selon leur statut à la mutation. On observe deux nuages de points distincts (rouge pour les homozygotes porteurs et noir pour les homozygotes non porteurs) quel que soit l'âge de l'animal. Il en résulte que l'écart de concentration leucocytaire sanguine entre les deux groupes n'est pas influencé par l'âge des animaux (différence non significative)

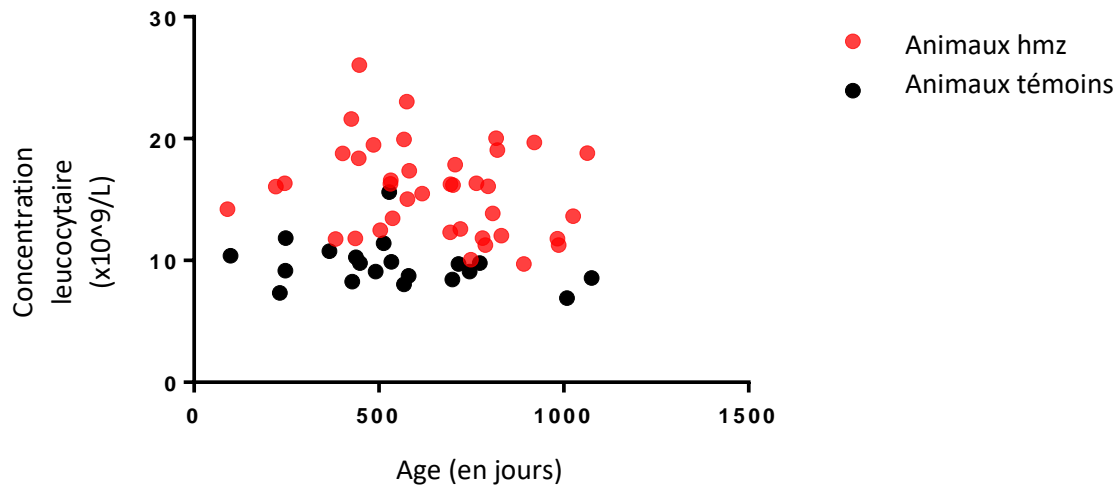


Figure 35 : Concentration leucocytaire sanguine en fonction de l'âge de l'individu selon le statut à la mutation

### *b-Cytométrie en flux*

Afin de caractériser la population lymphocytaire dont le nombre est augmenté dans le sang des homozygotes mutés, une analyse en cytométrie de flux a été réalisée à l'aide d'anticorps spécifiques. La figure 36 ci-dessous représente les informations obtenues lors de cette analyse qui a été réalisée sur les échantillons collectés chez trois individus homozygotes mutés et des animaux témoins. En abscisse on retrouve l'expression de la fluorescence pour le marqueur CD45R0 (mémoire), et en ordonnée selon le marqueur CD4 (lymphocyte T-CD4). Le cadran supérieur droit (encadré en rouge) contient la population des lymphocytes TCD4 mémoires ; la proportion de cellules est anormalement élevée (brillance sur le dot-plot) chez les homozygotes porteurs ce qui signifie que l'augmentation de la numération est due en partie à une augmentation du nombre de ces cellules mémoire dans le sang

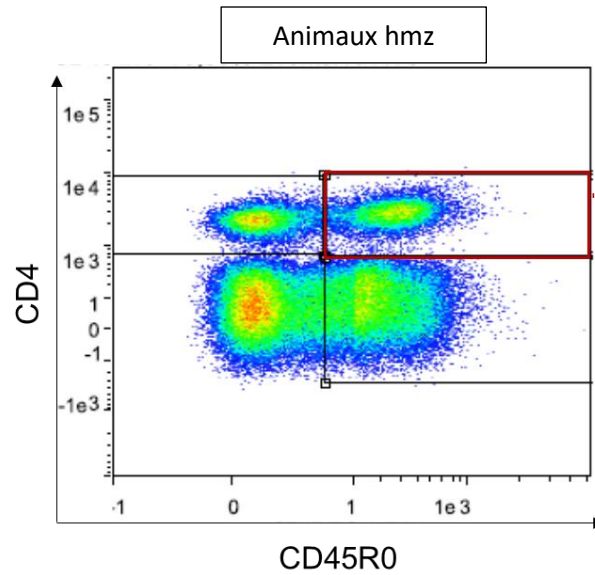


Figure 36 : Cytométrie en flux pour le marqueur « lymphocyte T-CD4 mémoire » chez les individus homozygotes mutés

Pour savoir si l'anomalie ITGB7 a une influence sur l'expression du complexe LPAM-1, d'autres anticorps fluorescents ont été utilisés ; ils permettent de distinguer séparément l'expression de  $\alpha 4$  en ordonnée et de  $\beta 7$  en abscisse. Les résultats sont présentés à la figure 37 ci-dessous.

Concernant l'échantillon sanguin, les cellules exprimant les intégrines  $\alpha 4$ ,  $\beta 7$ , les deux ou aucune, sont uniformément réparties en proportion chez les animaux témoins. Cependant, on constate que les animaux homozygotes ont plus de lymphocytes en nombre que les animaux témoins (brillance plus marquée). Les cellules exprimant  $\beta 7$  et celles exprimant  $\alpha 4\beta 7$  sont diminuées en proportion chez les animaux homozygotes pour la mutation par rapport aux animaux témoins (décalage de la brillance vers la gauche). On peut en conclure que, chez les animaux mutés, l'intensité d'expression de l'intégrine  $\beta 7$  est moindre à la surface des lymphocytes qui expriment LPAM1 indiquant un défaut d'expression du complexe moléculaire à la surface des cellules du sang.

Concernant l'échantillon prélevé in situ sur la lamina propria (manipulations supplémentaires lors d'autopsies), les lymphocytes exprimant  $\beta 7$  et celles exprimant  $\alpha 4\beta 7$  sont totalement absentes dans la sous-muqueuse intestinale (quasi absence de cellules entourée en rouge sur le schéma). Cette absence indique que les rares lymphocytes exprimant le complexe LPAM-1 présents dans le compartiment sanguin n'ont pas pu migrer correctement vers leur site d'adressage. Ces résultats confirment le défaut de localisation des lymphocytes CD4 LPAM1+ chez les animaux mutés.

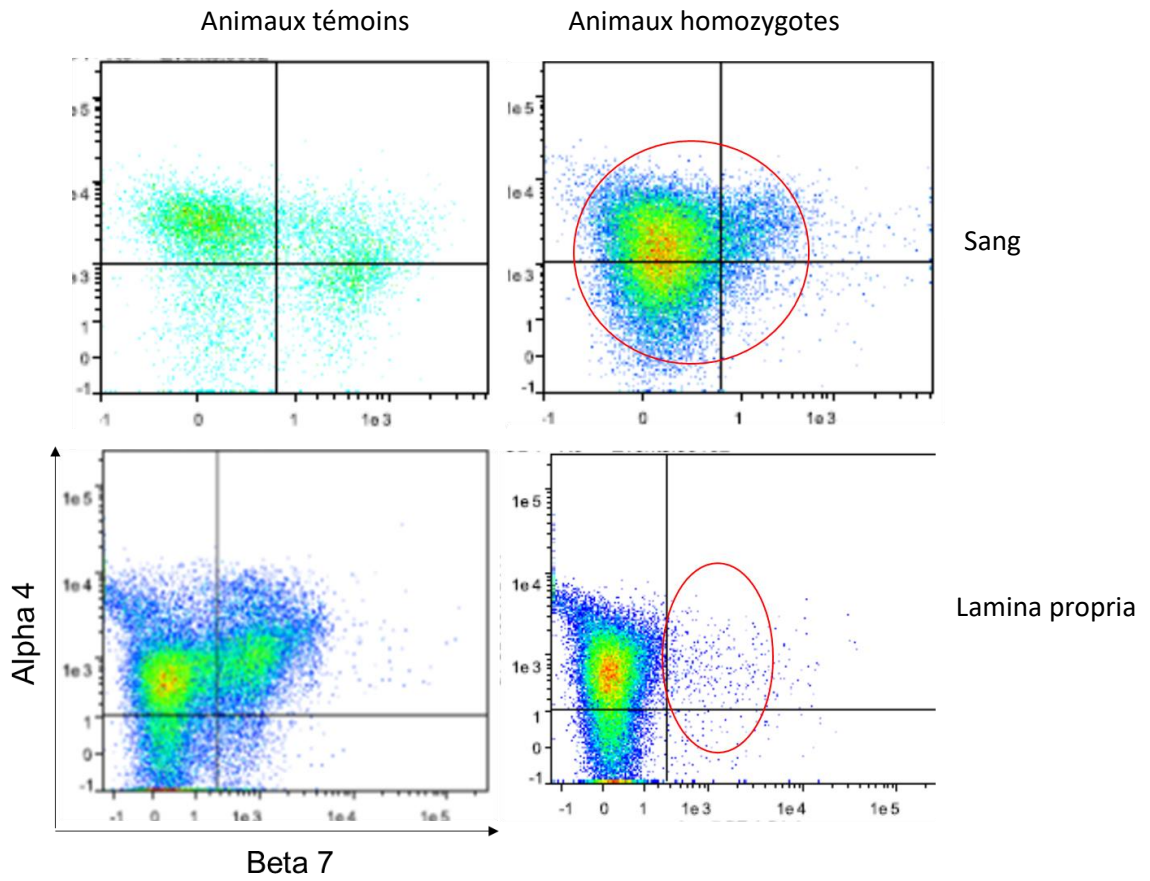


Figure 37 : Résultats des analyses en cytométrie de flux avec des marqueurs spécifiques de  $\alpha 4$  et  $\beta 7$  dans le sang et dans la lamina propria

## V) Discussion générale

Au cours du siècle dernier, l'industrie laitière française s'est développée pour devenir dans certaines régions un système agricole intensif prospère, témoignant de décennies de recherches et d'innovations. Cette rentabilité est due en partie à la sélection génétique de bovins plus productifs sur de nombreuses générations mais aussi à l'expansion d'une race haute productrice : la Prim'Holstein. L'amélioration spectaculaire des capacités productives de cette race a cependant un inconvénient majeur : l'augmentation très marquée de la consanguinité au sein de la race. Cette consanguinité a des conséquences majeures avec la naissance d'animaux homozygotes à la suite de l'apparition d'anomalies génétiques. L'augmentation de la consanguinité de 1% diminue par exemple le taux de réussite à l'insémination artificielle de 0,27%. Par ailleurs, l'appariement d'animaux consanguins augmente la probabilité d'obtenir un produit homozygote pour une anomalie génétique déjà existante (D. Boichard et al., 2016a). Certaines anomalies génétiques sont aujourd'hui très connues des différents acteurs du milieu de l'élevage (vétérinaires, inséminateurs, éleveurs). Par exemple, les individus siamois, l'hydrocéphalie, la fente palatine et la syndactylie sont facilement identifiables car elles sont visibles dès la naissance du veau. D'autres sont mêmes avantageuses pour les systèmes de production comme l'absence de cornes ou l'hypertrophie musculaire de l'arrière train (veau culard). Cependant, il existe des anomalies génétiques qui sont plus discrètes, voire invisibles, et l'existence de la cause génétique n'est que rarement suspectée si elle n'est pas connue *a priori*. Pourtant, elles ont parfois des coûts importants en diffusant à bas bruit dans la population bovine. La mise en lumière de ces nouvelles anomalies par les approches de génétique inverse est un champ de recherche innovant et en plein développement. Cette méthode, aujourd'hui couramment utilisée dans les équipes de recherche en génétique, consiste à repérer, via l'analyse de données de génotypage, des déficits d'individus homozygotes pour un allèle donné. C'est ce qu'on appelle communément la dépression de consanguinité. Il est possible de trouver une explication à ce déficit en réalisant par exemple des courbes de survie sur un très grand nombre d'animaux. Selon l'allure de cette courbe, l'anomalie peut être définie comme précoce ou tardive. Ainsi, sans même l'examen d'un seul animal atteint, il est possible de suspecter l'existence d'une anomalie avec des conséquences sur la longévité.

Les travaux de cartographie menés par INRAe sur le génome bovin de trois races différentes ont permis d'identifier des déficits en homozygotes, qui désignent des haplotypes d'intérêt, qui sont caractérisés par un enchainement de nucléotides variants par rapport à la séquence de référence. Après application de multiples filtres de sélection, les variants restants sont considérés comme les variants d'intérêt, certains pouvant conduire à une variation de la séquence protéique avec parfois des conséquences fonctionnelles chez l'organisme qui la porte. A chaque variant est associé une anomalie génétique et un projet de recherche peut alors être initié pour en caractériser les différents aspects. Il est donc possible de découper le travail de l'étude de l'anomalie selon différents angles : l'étude de la mortalité associée, de

l'impact zootechnique, des mécanismes physiopathologiques et de l'expression clinique de l'anomalie génétique.

En 2019, 34 anomalies génétiques ont été identifiées par cette méthode. Cette thèse vétérinaire retrace une partie du travail de recherche portant sur l'étude de la physiopathologie de l'anomalie du gène *Itgb7* dans la race bovine Prim'Holstein. Son objectif est la description fine du phénotype des individus porteurs homozygotes avec une caractérisation clinique et lésionnelle.

Le gène *Itgb7* est un gène très conservé chez les mammifères et il code pour une protéine essentielle à de nombreuses fonctions de l'organisme : l'intégrine  $\beta 7$ . Son rôle immunitaire est décrit chez l'Homme et chez la souris mais très peu chez le bovin. Afin d'anticiper les conséquences pathogéniques que pourrait avoir une telle anomalie d'ITGB7 chez le bovin, il a donc fallu transposer les données disponibles chez les autres espèces. Ces recherches visent souvent à prouver l'efficacité d'un traitement contre la maladie de Crohn, tels que le vedolizumab® ou le natalizumab®, qui utilise des anticorps monoclonaux dirigés contre l'hétérodimère  $\alpha 4\beta 7$  aussi appelé LPAM-1. La maladie de Crohn est, chez l'Homme, une maladie inflammatoire chronique de l'intestin aujourd'hui considérée comme multifactorielle. L'inflammation chronique de la muqueuse digestive est à l'origine d'un syndrome digestif impliquant, entre autres, des douleurs abdominales, une diarrhée persistante et une perte de poids secondaire à une malabsorption intestinale (Veauthier and Hornecker, 2018) L'intégrine  $\beta 7$  a été décrite dans de nombreuses études pour sa liaison avec l'intégrine  $\alpha 4$  pour former le dimère LPAM-1. LPAM-1 est un récepteur présent à la surface des lymphocytes TCD4 déjà activés qui, lorsqu'il se lie à MAdCAM-1, permet leur adressage dans les tissus digestifs (Girard et al., 2015).

Les travaux de recherche réalisés en amont sur la localisation précise du variant à l'origine de l'anomalie permettent d'obtenir les informations suivantes : la substitution d'un nucléotide de la séquence du chromosome 5 entraîne la transformation d'une glycine en une sérine en position 375 sur la séquence protéique de l'intégrine  $\beta 7$ . Ce changement dans la séquence protéique entraîne une modification de sa structure quaternaire ce qui diminuerait la surface d'interaction avec  $\alpha 4$ . Les possibilités d'interaction de l'hétérodimère  $\alpha 4\beta 7$ , ou LPAM-1, avec le ligand MAdCAM-1 pourraient alors être diminuées, voire abolies à la suite d'un défaut d'expression à la surface ou d'une diminution d'affinité pour le ligand. Cette interaction est pourtant nécessaire à la diapédèse des lymphocytes T depuis le compartiment vasculaire vers le GALT. (Vlasova and Saif, 2021)

Les animaux atteints de l'anomalie d'ITGB7 devraient présenter une accumulation des lymphocytes dans le compartiment vasculaire par déficit de migration vers le territoire digestif. Dans des études publiées, le blocage de LPAM-1 par des anticorps monoclonaux spécifiques permet d'empêcher l'entrée des lymphocytes dans la paroi intestinale ou dans le site inflammatoire, permettant de diminuer les signes associés à l'inflammation intestinale chronique (von Andrian and Engelhardt, 2003) (Hao Sun et al., 2020) (Rivera-Nieves et al., 2005). L'anomalie d'ITGB7 entrainerait donc une défaillance de la réaction inflammatoire au niveau des muqueuses digestives. Les animaux atteints pourraient alors présenter un syndrome



digestif associé à de la diarrhée et de la déshydratation (McNeilly et al., 2007) . La propagation d'un pathogène au compartiment sanguin depuis le GALT défaillant pourrait même entraîner un sepsis et de la mortalité.

Cette anomalie a une prévalence très élevée au sein de la population de bovins de race Prim'Holstein : la fréquence du variant est estimée à 4,8%. En théorie, cela signifie qu'il y aurait en France plus de 215 000 bovins porteurs du variant, avec un exemplaire au moins. Pour qu'une anomalie génétique puisse diffuser à ce point dans une population, les symptômes engendrés doivent être particulièrement peu repérables et peu imputables à une cause génétique. Cette transmission massive est également permise par la reproduction avec une diffusion à grande échelle de la semence des taureaux porteurs de l'anomalie. Ce phénomène est assez courant dans la race Prim'Holstein notamment à cause de l'insémination artificielle et la quasi-généralisation de son utilisation. La semence d'un même taureau peut alors être utilisée sur des milliers de femelles. Le premier porteur de l'anomalie, chez lequel la mutation est apparue, conduit à la naissance de milliers d'individus porteurs hétérozygotes. Après plusieurs générations, la probabilité qu'un des descendants mâles hétérozygotes soit accouplé à une femelle hétérozygote devient progressivement très élevée. Cette accouplement a une probabilité de 25% de produire un animal homozygote pour l'allèle muté, et susceptible d'être atteint cliniquement.

L'évaluation précise de la mortalité associée au portage homozygote du variant T.G375S est difficile par manque de recul sur l'anomalie. Cependant des moyens détournés permettent de l'estimer. Des courbes de survie sur un très grand nombre d'animaux ont été réalisées dans le but d'orienter vers le type de mortalité et le moment de sa survenue. La mortalité associée est progressive à partir d'un âge déjà tardif. Il est possible de trouver l'âge médian de survie soit l'âge auquel 50% des animaux homozygotes sont déjà morts. Pour l'anomalie *Itgb7*, cette durée est de 1500 jours, alors qu'elle est de 1950-2000 jours dans la population de référence. Il y a donc bien une mortalité accrue en lien avec le portage du variant et celle-ci semble assez tardive. Or, une anomalie génétique associée une mortalité tardive présente un coût bien plus conséquent qu'une anomalie associée à une mortalité précoce ou à des avortements.

Le grand nombre d'individus atteints sans que la cause sous-jacente n'ait pu être identifiée, car non détectés, motive l'établissement d'un phénotype plus précis. A cette fin, depuis octobre 2019, la puce de génotypage bovine est dotée du marqueur pour le variant T.G375S ; elle permet de repérer les individus porteurs de ce variant. Les bovins homozygotes sont recrutés pour l'étude et la caractérisation. Une enquête terrain a été conduite en France sur une période entre les années 2021 et 2023. Cette enquête a permis la description clinique des animaux atteints et l'obtention d'échantillons biologiques analysés au fur et à mesure des besoins de l'étude. Cette enquête a permis à ce jour d'obtenir des premiers résultats : les individus atteints par l'anomalie présentent un retard de croissance marqué. Leur poids est inférieur à celui décrits dans les objectifs de croissance de la race Prim'Holstein et au poids des animaux témoins dans les élevages qui les hébergent.

Cette étude met en lumière un paradoxe entre les données disponibles dans la bibliographie et les résultats obtenus. Les animaux homozygotes examinés lors de l'enquête terrain ne présentent pas de signes d'atteinte digestive. D'après l'analyse des carnets sanitaires, les sujets examinés n'ont pas connu d'épisode morbide individuel orientant vers une faible immunité digestive. Les animaux rencontrés ont un niveau d'ingestion qui semble peu modifié. Cependant, la moitié environ des animaux examinés présentent un retard de croissance marqué. Parmi eux, certains présentent un poil piqué et une cachexie sans atteinte de l'état de vigilance. Il semble qu'il y ait deux catégories d'animaux parmi ceux qui ont pu être examinés : Après la première enquête terrain, il semble que les animaux homozygotes autour de neuf mois d'âge sont ceux présentant l'atteinte phénotypique la plus marquée.

Les observations, de prime abord déroutantes, n'indiquent pas la présence de symptômes digestifs. Cette absence de signes digestifs peut s'expliquer par : une diminution peu marquée et donc sans conséquence et/ou un phénomène de compensation de l'immunité locale. Une première hypothèse pourrait être que la diminution du nombre de lymphocytes dans la paroi digestive perturbe fortement la croissance des animaux porteurs de l'anomalie en engendrant une malabsorption des nutriments de la ration. Certains animaux vivant dans un environnement favorable arrivent à compenser ce retard de croissance tandis que d'autres subissent de la mortalité par dégradation de leur état corporel. Ce phénomène de perturbation de l'absorption intestinale, s'il existe, est théorique et n'est à ce jour pas décrit.

La mesure du périmètre thoracique a été réalisée sur chaque animal examiné au moment de l'enquête terrain. A l'aide d'un tableau de conversion propre à la race Prim'Holstein, le poids des individus cas et témoins a pu être estimé. Il apparaît alors que les individus homozygotes sont de manière générale moins lourds que les individus de génotype sauvage et ce quel que soit l'âge au moment de la mesure. Cette différence de poids s'explique par la combinaison du retard de croissance et du faible état corporel. Une deuxième observation est l'écart de poids apparemment plus élevé autour de l'âge de neuf mois, tendance qui avait déjà été suspectée lors des premières visites dans les fermes. Des courbes de suivi de poids ont été réalisées à partir d'un grand nombre de bovins de l'unité expérimentale du Pin-au-haras. Ces données permettent une évaluation plus fine du moment où survient le décrochage des individus homozygotes mutés car la mesure du poids est mensuelle et faite à l'aide d'une balance numérique. De plus, ces données ont permis de prouver l'absence d'effet de la mutation à l'état hétérozygote sur la croissance. Cela permet d'affirmer que la mutation étudiée est bien récessive.

L'enquête terrain a permis la description phénotypique fine de l'anomalie mais aussi la récolte d'échantillons biologiques incluant du sang veineux. La réalisation de la numération et de la formule sanguines sur ces échantillons montre une augmentation du nombre de leucocytes dans le compartiment sanguin ; cette augmentation est d'environ 60%. La leucocytose observée est majoritairement due à l'augmentation du nombre de lymphocytes et d'éosinophiles. D'après le résultat de la cytométrie en flux, les lymphocytes en nombre augmenté ont pu être caractérisés plus spécifiquement : ce sont des lymphocytes TCD4 et TCD8. Ces résultats ont permis de confirmer le nom donné à l'affection liée au double portage du variant délétère : le

BLIRD soit « Bovine Lymphocytes Intestinal Retention Deficit ». Les lymphocytes TCD4 sont présents dans la sous-muqueuse digestive (lamina propria) permettant le développement d'une réponse immunitaire spécifique pour un antigène donné. Chez les individus porteurs de l'anomalie, la diminution de la diapédèse vers le GALT à cause du changement de la structure de LPAM-1 expliquerait la lymphocytose sanguine. L'intégrine  $\beta 7$  peut également être exprimée à la surface des lymphocytes T-CD8 éventuellement avec un dimère différent lorsqu'elle s'apparie à  $\alpha E$ . L'hétérodimère  $\alpha E\beta 7$  fonctionne de la même manière qu' $\alpha 4\beta 7$  (Defaweux, 2007); il permet l'adressage des lymphocytes T-CD8 vers le GALT. En retrouvant le même phénomène de lymphocytose pour les lymphocytes T CD8 cytotoxiques dans le compartiment vasculaire, on peut faire l'hypothèse que la modification de la structure de l'intégrine  $\beta 7$  causée par la mutation entraîne une modification de la structure quaternaire de l'hétérodimère  $\alpha E\beta 7$  et que l'affinité pour le ligand E-cadhérine est elle aussi diminuée. Or, les lymphocytes TCD8 cytotoxiques spécialisés sont présents physiologiquement dans l'épithélium et la sous-muqueuse, et permettent, entre autres, le maintien de l'intégrité de la muqueuse digestive en détruisant les entérocytes infectés par des pathogènes intracellulaires. On peut faire l'hypothèse que si les lymphocytes ne peuvent plus être adressés vers les villosités, un recrutement cellulaire moindre facilite la prolifération des pathogènes intracellulaires. La disparition des microvillosités intestinales a de nombreuses conséquences, dont un phénomène de malabsorption chez les bovins ; ce phénomène pourrait expliquer en partie le retard de croissance observé chez certains animaux (Overeem et al., 2016). Cependant, l'absence d'entérite et de diarrhée chez les sujets atteints n'est pas cohérente avec cette hypothèse et n'est pas expliquée pour l'instant.

De manière similaire, les résultats de l'hémogramme indiquent la présence d'une éosinophilie. L'hétérodimère  $\alpha 4\beta 7$  est également exprimé à la surface des éosinophiles pour un adressage respiratoire (BALT) (Sharma et al., 2017) mais également digestif (Brandt et al., 2006b) ; ces cellules sont impliquées dans la réponse vis-à-vis des infestations parasitaires (Artis et al., 2000). La rétention d'un grand nombre d'éosinophiles dans le compartiment sanguin pourrait aggraver les signes et les lésions en cas d'infestation parasitaire intestinale ou pulmonaire chez les homozygotes. Des examens coproscopiques auraient pu être réalisés pour explorer cette hypothèse. Cependant, la majorité des animaux homozygotes n'avaient pas été mis à l'extérieur et donc la probabilité d'un portage parasitaire restait faible. De plus, le traitement préventif le plus souvent utilisé chez les animaux dans notre enquête est une vermifugation avec une lactone macrocyclique comme principe actif. Enfin, le portage parasitaire en élevage laitier dans les bassins intensif Normand et Breton est souvent faible car la gestion parasitaire est maîtrisée par la majorité des éleveurs.

Cette étude comporte cependant, des biais et des limites qu'il est important de considérer pour la validation scientifique des résultats. Premièrement, le processus de recrutement des animaux n'est pas aléatoire : les bovins de l'étude sont recrutés à partir du pool de bovins génotypés en France. Or, les élevages souscrivant au service de génotypage sont de façon générale de meilleure technicité que la moyenne des élevages. En théorie, cela signifie que les facteurs zootechniques tels que l'alimentation, le logement et la gestion sanitaire sont mieux maîtrisés. Cela est d'autant plus vrai lorsqu'on considère la ferme expérimentale du Pin-au-haras. Cet

échantillonnage induit donc un premier biais : les individus qui ont été évalués ont une moindre probabilité de contracter une infection ou une infestation, et d'exprimer les symptômes associés. De même, une alimentation de bonne qualité et distribuée en quantité suffisante permet une optimisation de la croissance des bovins dans ces élevages. Un individu porteur de l'anomalie dans un élevage de moindre technicité pourrait en théorie présenter un retard de croissance et une dégradation clinique encore plus marqués. De plus, au sein d'un même élevage, parfois seuls les individus les plus prometteurs sont génotypés ce qui induit un autre biais de recrutement. L'échantillonnage dépend également du volontariat des éleveurs à participer à l'enquête, et ce paramètre n'est pas maîtrisable. Durant le recrutement de l'été 2021, de nombreux refus de participation à l'étude étaient liés à la difficulté à accéder aux animaux en raison du pâturage des génisses dans les élevages avec un système pâturant, ce qui rendait la contention et l'examen clinique difficiles lors de la visite.

Les données récoltées auraient pu être complétées en améliorant la précision de la description clinique. Premièrement, l'estimation du poids des animaux est une donnée qui ne reflète pas tous les aspects du bovin. La notation systématique de la Note d'Etat Corporel (NEC) aurait permis de mieux apprécier l'état d'engraissement des animaux de l'étude. Cependant, l'établissement d'une NEC pour un individu (de 1 à 5) est un outil d'appréciation subjective et qui est en outre opérateur-dépendante. La participation de deux opératrices pour la récolte des données aurait induit un biais dans l'évaluation de la NEC. De même, le caractère « ostensiblement visible d'un plus petit gabarit » n'est qu'un ressenti visuel dépendant des animaux présents autour de lui. Sa prise en compte complèterait l'idée générale de l'ampleur du phénomène de retard de croissance. Deuxièmement, durant la première enquête terrain à l'été 2021, les informations sur les facteurs extrinsèques liés au mode d'élevage étaient systématiquement enregistrées via le remplissage par les éleveurs d'un questionnaire. La ration alimentaire, le mode de distribution et le déroulement du sevrage étaient ainsi renseignés pour chaque animal (disponible en annexe). Cependant, l'analyse de ce questionnaire a été abandonnée à cause de la grande variabilité des réponses obtenues et la complexité de leur utilisation dans le cadre de l'étude. Enfin, une étude sur l'absorption des nutriments aurait permis d'approfondir la compréhension du retard de croissance. Les fèces prélevées chez les individus homozygotes et leurs témoins pourraient être analysées afin de déterminer si la valorisation du bol alimentaire est différente selon le statut à la mutation.

Les autopsies réalisées sur des animaux identifiés rétrospectivement porteurs homozygotes de l'anomalie manquent d'exhaustivité et de précision et n'ont pas pu être utilisées dans cette étude. Quatre rapports d'autopsies ont ainsi été examinés, dont trois issus de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes et un de la ferme expérimentale du Pin-au-Haras. L'absence de lésions macroscopiques est systématique et semble confirmer nos premières observations.

Le suivi d'animaux homozygotes sur le moyen terme permet de surveiller l'apparition de symptômes qui n'avaient pas été observés précédemment. A cette fin, les éleveurs ayant participé à l'étude de l'été 2021 ont été rappelés en mars 2023. Malheureusement, l'absence de réponse d'un grand nombre d'entre eux n'a pas permis d'obtenir des informations statistiquement exploitables. L'hospitalisation d'un

animal à l'ENVT pendant plusieurs mois aura permis de surveiller l'évolution clinique du BLIRD. Cependant, aucun symptôme notable n'a été observé au cours de cette période.

Un biais dans l'étude physiopathologique du BLIRD est la difficulté à recruter des animaux témoins contemporains, l'idée de se procurer des animaux témoins dans les mêmes élevages étant exclus. Seuls 24 couples de cas-témoins appariés avec moins de 1 mois de différence d'âge ont pu être formés à partir des 40 évalués. Cette différence est causée par deux difficultés rencontrées au cours de l'étude. En premier lieu, aucun individu témoin n'était présent dans le troupeau : lorsque l'élevage est de petite taille, le rythme des naissances ne permet pas d'avoir deux animaux nés avec un écart inférieur à un mois; de même, d'autant plus si seuls les animaux d'intérêt sont génotypés, il est donc très fréquent qu'aucun contemporain génotypé du même âge que la génisse porteuse de l'anomalie soit présent. D'autre part, les individus témoins présélectionnés (contemporains non porteurs) peuvent ne pas être accessibles lors de la visite car ils étaient hébergés dans un endroit différent de celui de l'homozygote, notamment lorsque ces derniers ont redoublé de lot. Certains témoins ne sont alors plus présents dans le même bâtiment, et/ou ont un système de contention différent ce qui rend impossible la photographie, l'examen clinique et les prélèvements. Le déplacement de la génisse pour les regrouper est assez souvent refusé par l'éleveur, par manque de temps. Dans cette situation, un autre individu témoin doit être choisi sur place mais avec un écart d'âge plus grand. La comparaison des poids de ces individus est moins pertinente car elle ne prend pas en compte la prise de poids liée à la différence d'âge. Cet effet est d'autant plus grand que l'animal est jeune, c'est-à-dire âgé de moins de 18 mois au moment où la croissance est rapide.

L'étude du BLIRD avait également pour vocation de déterminer si la mutation avait un effet à l'état hétérozygote. L'analyse des données sanitaires fournies par l'unité expérimentale du Pin-au-Haras a contribué à répondre à cette question. Elles retracent l'ensemble des événements sanitaires des animaux qui ont été produits dans cette unité. Ces données n'étant pas recueillies de façon exhaustive, notamment à cause de l'absence de distinction entre traitements préventifs et curatifs. La grande variabilité de la forme des données collectées empêchant tout traitement systématique, cette analyse sur un grand nombre d'animaux a été abandonnée.

La résolution de la physiopathologie du BLIRD n'est à ce jour pas encore terminée. Les mécanismes biologiques à l'origine des différents phénotypes cliniques et lésionnels ne sont pas totalement compris. La méthodologie et les premiers résultats décrits dans cette thèse sont utilisés comme base pour la réalisation de travaux de recherche plus ambitieux. De même, l'ensemble de ces résultats sont permis par la coopération entre l'équipe de recherche en immunologie de l'UMR IHAP et différents groupes de recherche d'INRAe et ils feront l'objet de publications ultérieures.

Dans ce contexte, d'autres études et expérimentations sont actuellement en cours et permettront à l'avenir de mieux comprendre la pathogenèse du BLIRD. A ce jour, une étude de données zootechniques a pour objectif de savoir si l'anomalie du gène *Itgb7* entraîne une diminution de la fertilité des génisses qu'elles soient homozygotes ou hétérozygotes. Les données (dates de mise à la reproduction et

nombre d'inséminations artificielles) sont celles disponibles via les logiciels de suivi en élevage. A l'ENVT, des autopsies exhaustives de trois animaux porteurs homozygotes ont été réalisées. L'observation, la réalisation de photographies et de prélèvements pour histologie chez ces animaux comparés à des témoins devraient permettre de vérifier l'existence d'une modification de la structure macroscopique et microscopique de la paroi intestinale au niveau des plaques de Peyer, dans le GALT, comme retrouvé dans la littérature scientifique dans le cas d'inactivation du gène *Itgb7* (Wagner et al., 1996) (Hao Sun et al., 2020).

Enfin, cette thèse d'exercice vétérinaire aura permis d'établir les premiers résultats concernant le phénotype des individus atteints du BLIRD sans pour autant expliquer quel est le mécanisme biologique sous-jacent. Les individus les plus atteints présentent un retard de croissance marqué associé à une cachexie et à un mauvais état clinique, sans qu'aucune complication infectieuse digestive n'ait été observée. Les plus atteints meurent consécutivement à la dégradation de leur état corporel probablement à la suite d'un déficit métabolique trop marqué. Ainsi, cette anomalie permet de répondre en partie au questionnement de l'existence de veaux chétifs et en mauvais état clinique pour lesquels une cause génétique n'avait jamais été envisagée.

Les premiers résultats sur les hémogrammes et l'analyse en cytométrie de flux permettent également d'apporter de nouvelles connaissances sur le fonctionnement de l'adressage des lymphocytes et des éosinophiles. En effet, si jusque-là des mécanismes avaient été décrits chez l'Homme et la souris, ces travaux sont à notre connaissance les premiers les décrivant dans l'espèce bovine. Les résultats obtenus concordent avec les observations dans les autres espèces et les hypothèses formulées. Cependant, la littérature décrit qu'une inactivation totale du gène *Itgb7* et/ou un blocage du complexe LPAM-1 entraîne une diminution du nombre de lymphocytes *in situ* mais aucun article ne décrit qu'une modification seule de la structure de l'hétérodimère entrainerait une telle rétention dans le compartiment vasculaire. L'originalité de ces travaux permet donc un approfondissement des connaissances sur un gène et une intégrine qui serviront notamment à la recherche en médecine humaine et à la recherche fondamentale. A ce jour, les anticorps monoclonaux présents dans les traitements tels que le vedolizumab® ou le natalizumab® dirigés spécifiquement contre l'hétérodimère  $\alpha 4\beta 7$  sont couramment utilisés en médecine humaine. Malgré une efficacité démontrée par la diminution des signes cliniques chez certaines personnes atteintes d'inflammation digestive chronique, 36 à 54 % des patients avec une maladie de Crohn n'ont pas de bénéfice clinique, sans que la raison en soit actuellement connue (Hao Sun et al., 2020).

L'anomalie du gène *Itgb7* est donc consécutive à une mutation autosomale récessive d'importance majeure tant au niveau économique au vu de sa prévalence et du coût élevé qu'elle entraîne, qu'au niveau sanitaire et du bien-être animal. Les travaux de recherche sur cette anomalie ayant conduit à l'inclusion du variant sur les puces de génotypage, les éleveurs souscrivant à ce service et les entreprises d'insémination artificielle peuvent repérer les bovins porteurs hétérozygotes de la



mutation parmi les femelles génotypées. Cette information leur permet d'éviter les accouplements à risque en n'inséminant pas ces femelles avec un taureau lui-même porteur hétérozygote. De cette manière, la disparition du BLIRD sera probablement assez rapide dans les troupeaux génotypés, et comme le BLAD, disparaîtra progressivement.

Des anomalies génétiques seront toujours présentes et détectées dans le cheptel bovin. Si la sélection génétique a permis l'amélioration considérable de la capacité de production des races bovines améliorées, c'est au prix d'une forte consanguinité. Leur éradication totale est impossible, mais il est envisageable d'essayer de limiter leur impact au maximum, en contrôlant leur fréquence et leur diffusion. Toute mesure tendant à accroître la diversité génétique réduit la probabilité que ces anomalies aient des conséquences (D. Boichard et al., 2016a). À l'inverse, toute utilisation excessive d'un nombre limité de reproducteurs induit un risque fort d'émergence future. Une utilisation raisonnable et homogène d'un nombre assez élevé de reproducteurs mâles est une mesure fortement recommandée. L'étude de (Pryce et al., 2012) propose une méthode systématisée, améliorée par (Cole, 2015), afin de réaliser des accouplements raisonnés dans les élevages : l'utilisation d'une matrice GRM permet l'ajout de pénalités dans le calcul des index de performance de la descendance d'animaux consanguins. De plus, un nombre maximal d'inséminations est imposé à chaque taureau. Ainsi, il faut recommander aux éleveurs de changer régulièrement la provenance des paillettes utilisées pour les inséminations artificielles.

La description clinique d'une anomalie découverte par génétique inverse est à ce jour peu fréquente ce qui fait l'originalité de ce manuscrit. En effet, cette approche de recherche de déficits en homozygotes mise au point en 2011 (VanRaden et al., 2011) a été améliorée par l'équipe de recherche, constituée de membres d'INRAe et de l'ENVT, porteuse entre autres du projet de cette étude sur *Itgb7*. Depuis 2020, la recherche de variants délétères consiste à repérer des enrichissements et appauvrissements en nombre au sein de groupes d'animaux aux trajectoires de vie différentes. Cette nouvelle méthode a permis de repérer 34 haplotypes délétères parmi lesquels 15 ont pu être associés à un nucléotide variant causal. (Guintard et al., 2022). Cependant, la description des symptômes associés à ce portage homozygote n'est pas réalisée systématiquement car cela nécessite la participation de vétérinaires pouvant réaliser des examens cliniques exhaustifs, des analyses biologiques appropriées afin d'émettre une description fine des phénotypes observés. Ainsi, à ce jour seules deux des mutations identifiées par l'équipe de recherche d'INRAe ont été caractérisées phénotypiquement. La première concerne une mutation sur le gène *NOA1* affectant la race Montbéliarde. Les veaux homozygotes présentent une cachexie, une diarrhée et une incapacité à se tenir debout. Une forte mortalité est associée : 50% des individus meurent avant 41 jours de vie. La deuxième concerne une mutation sur le gène *RFC5* affectant la race Normande. Les animaux porteurs homozygotes de l'anomalie présentent un retard de croissance, une diarrhée chronique et une modification du pelage (poils fins et bouclés) et une alopecie des extrémités des quatre membres. De la mortalité est également observée entre 6 mois et 3 ans. (Guintard et al., 2022).

Une thèse universitaire soumise en 2022 à l'université de Berne présente la liste des anomalies génétiques bovines identifiées par approche classique et par génétique inverse (méthode de déficit en individus homozygotes) (Häfliger, 2022). Seuls trois articles présentent des anomalies identifiées par la méthode de génétique inverse (relatant respectivement l'identification de 4 nouveaux variants délétères en race Prim'Holstein, de 6 nouveaux variants délétères en race Brune, et 11 haplotypes en race Simmental) contre 21 pour l'approche classique. Si ces anomalies identifiées par génétique inverse sont plus rares, cela est dû à la discrétion des symptômes engendrés et à la mise en place récente de cette nouvelle méthode d'identification. Il est probable que dans les années à venir de plus en plus d'anomalies génétiques seront repérées grâce à cette méthode.

La réalisation et la diffusion auprès d'un public averti de travaux de recherche sur les anomalies génétiques permet également de souligner l'importance des actions menées par l'ONAB, INRAE et la réunion des organismes et établissements de sélection dans ELIANCE. Un maillon supplémentaire pour l'établissement des anomalies dans les élevages est le signalement par les acteurs de la filière, d'animaux nés différents ou évoluant de façon anormale. Aujourd'hui, seulement 20 % des signalements sont réalisés par des vétérinaires contre 43 % par les centres d'insémination artificielle (Alain Ducos, communication personnelle 2021). Pourtant une description phénotypique fine, précise et rigoureuse n'est possible qu'après un examen vétérinaire d'où l'importance de leur formation à cette problématique dont peu aujourd'hui connaissent les enjeux. De manière générale, l'étude d'anomalies génétiques, qui provoquent une perturbation en dehors de la gamme physiologique normale, permet de comprendre un mécanisme habituellement peu variable, donc difficilement étudiable par ailleurs. Ces projets de recherche permettent donc de mieux comprendre le rôle des gènes au travers de leurs effets lorsqu'ils sont mutés.

## Références bibliographiques

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S., 2020. Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique, 6e édition. ed, Campus référence. Elsevier Masson, Issy-les-Moulineaux.
- Andrew, D.P., Rott, L.S., Kilshaw, P.J., Butcher, E.C., 1996. Distribution of  $\alpha 4\beta 7$  and  $\alpha E\beta 7$  integrins on thymocytes, intestinal epithelial lymphocytes and peripheral lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 26, 897–905. <https://doi.org/10.1002/eji.1830260427>
- Artis, D., Humphreys, N.E., Potten, C.S., Wagner, N., Müller, W., McDermott, J.R., Grencis, R.K., Else, K.J., 2000.  $\beta 7$  integrin-deficient mice: delayed leukocyte recruitment and attenuated protective immunity in the small intestine during enteric helminth infection. *Eur. J. Immunol.* 30, 1656–1664. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200006\)30:6<1656::AID-IMMU1656>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200006)30:6<1656::AID-IMMU1656>3.0.CO;2-Z)
- Bilan de variabilité génétique à partir des données de généalogies Races bovines laitières IDELE 2021, n.d.
- Boichard, D., Capitan, A., Danchin-Burge, C., Grohs, C., 2016a. Avant-propos : Anomalies génétiques. *INRAE Prod. Anim.* 29, 293–296. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2016.29.5.2995>
- Boichard, Didier, Grohs, C., Danchin-Burge, C., Capitan, A., 2016. Les anomalies génétiques : définition, origine, transmission et évolution, mode d'action. *INRAE Prod. Anim.* 29, 297–306. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2016.29.5.2997>
- Boichard, D., Grohs, C., Michot, P., Danchin-Burge, C., Capitan, A., Genestout, L., Barbier, S., Fritz, S., 2016b. Prise en compte des anomalies génétiques en sélection : le cas des bovins. *INRAE Prod. Anim.* 29, 351–358. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2016.29.5.3003>
- Bovine Genome Assembled [WWW Document], 2022. . Genome.gov. URL <https://www.genome.gov/12512874/2004-release-bovine-genome-assembled> (accessed 2.23.23).
- Brandt, E.B., Zimmermann, N., Muntel, E.E., Yamada, Y., Pope, S.M., Mishra, A., Hogan, S.P., Rothenberg, M.E., 2006a. The  $\alpha 4\beta 7$ -integrin is dynamically expressed on murine eosinophils and involved in eosinophil trafficking to the intestine. *Clin. Immunol. Allergy Exp. Allergy* 36, 543–553. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2006.02456.x>
- Brandt, E.B., Zimmermann, N., Muntel, E.E., Yamada, Y., Pope, S.M., Mishra, A., Hogan, S.P., Rothenberg, M.E., 2006b. The  $\alpha 4\beta 7$ -integrin is dynamically expressed on murine eosinophils and involved in eosinophil trafficking to the intestine. *Clin. Exp. Allergy* 36, 543–553. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2006.02456.x>
- Calderwood, D.A., 2004. Integrin activation. *J. Cell Sci.* 117, 657–666. <https://doi.org/10.1242/jcs.01014>
- Chen, J., Salas, A., Springer, T.A., 2003. Bistable regulation of integrin adhesiveness by a bipolar metal ion cluster. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 10, 995–1001. <https://doi.org/10.1038/nsb1011>
- Cole, J.B., 2015. A simple strategy for managing many recessive disorders in a dairy cattle breeding program. *Genet. Sel. Evol. GSE* 47, 94. <https://doi.org/10.1186/s12711-015-0174-9>
- Cribiu, E.P., Schibler, L., 2000. Introduction à la cartographie des génomes complexes.
- Defaweux, V., 2007. L'interface neuro-immune et l'expression de la protéine prion cellulaire dans le cadre des maladies à prions. Une étude comparative des espèces bovine et humaine.
- Doublet, A.-C., Croiseau, P., Fritz, S., Michenet, A., Hozé, C., Danchin-Burge, C., Laloë, D., Restoux, G., 2019. The impact of genomic selection on genetic diversity and genetic gain in three French dairy cattle breeds. *Genet. Sel. Evol. GSE* 51, 52. <https://doi.org/10.1186/s12711-019-0495-1>
- Duchesne, A., Grohs, C., Michot, P., Bertaud, M., Boichard, D., Floriot, S., Capitan, A., 2016. Du phénotype à la mutation causale : le cas des anomalies récessives bovines. *INRAE Prod. Anim.* 29, 319–328. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2016.29.5.3000>
- Ducos Alain, 2021. Présentation sur les affections héréditaires bovines.

- Elsik, C.G., Unni, D.R., Diesh, C.M., Tayal, A., Emery, M.L., Nguyen, H.N., Hagen, D.E., 2016. Bovine Genome Database: new tools for gleaning function from the *Bos taurus* genome. *Nucleic Acids Res.* 44, D834–D839. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1077>
- Fasquelle, C., Sartelet, A., Li, W., Dive, M., Tamma, N., Michaux, C., Druet, T., Huijbers, I.J., Isacke, C.M., Coppieters, W., Georges, M., Charlier, C., 2009. Balancing Selection of a Frame-Shift Mutation in the MRC2 Gene Accounts for the Outbreak of the Crooked Tail Syndrome in Belgian Blue Cattle. *PLoS Genet.* 5, e1000666. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000666>
- Floriot, S., Duchesne, A., Grohs, C., Hozé, C., Deloche, M. c., Fayolle, G., Vilotte, J. I., Boichard, D., Fritz, S., Boussaha, M., 2021. A missense mutation in the FZD7 gene is associated with dilution of the red areas of the coat in Montbéliarde cattle. *Anim. Genet.* 52, 351–355. <https://doi.org/10.1111/age.13055>
- Frantz, L.A.F., Bradley, D.G., Larson, G., Orlando, L., 2020. Animal domestication in the era of ancient genomics. *Nat. Rev. Genet.* 21, 449–460. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0225-0>
- Fritz, S., 2016. Anticiper l'émergence d'anomalies génétiques grâce aux données génomiques.
- Georges, M., Charlier, C., Hayes, B., 2019. Harnessing genomic information for livestock improvement. *Nat. Rev. Genet.* 20, 135–156. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0082-2>
- Girard, A., Rochereau, N., Roblin, X., Genin, C., Paul, S., 2015. Rôle et ciblage de l'intégrine  $\alpha\beta7$  dans la physiopathologie des MICI et de l'infection par le VIH. *médecine/sciences* 31, 895–903. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153110016>
- Grohs, C., Duchesne, A., Floriot, S., 2016. L'Observatoire National des Anomalies Bovines, son action et ses résultats pour une aide efficace à la gestion des anomalies génétiques. *INRA Prod. Anim.* <https://doi.org/307-318>
- Guintard, A., Besnard, F., Cano, M., Hozé, C., Leclerc, H., Boussaha, M., Grohs, C., Barbat, A., Fritz, S., Escoufflaire, C., Rivière, J., Péchoux, C., Danchin-Burge, C., Foucras, G., Relun, A., Plassard, V., Arcangioli, M.-A., Mattalia, S., Boichard, D., Capitan, A., 2022. 520. Massive detection of cryptic recessive genetic defects in livestock mining millions of life trajectories, in: *Proceedings of 12th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production (WCGALP)*. Wageningen Academic Publishers, pp. 2158–2161. [https://doi.org/10.3920/978-90-8686-940-4\\_520](https://doi.org/10.3920/978-90-8686-940-4_520)
- Gutiérrez-Reinoso, M.A., Aponte, P.M., García-Herreros, M., 2022. A review of inbreeding depression in dairy cattle: current status, emerging control strategies, and future prospects. *J. Dairy Res.* 1–10. <https://doi.org/10.1017/S0022029922000188>
- Häfliger, I.M., 2022. Forward vs. reverse genetics: a bovine perspective based on visible and hidden phenotypes of inherited disorders. <https://doi.org/10.48549/3486>
- Hao Sun, Kuk, Wun, Riviera nieves, Jesus, 2020. b7 Integrin Inhibition Can Increase Intestinal Inflammation by Impairing Homing of CD25hiFoxP3D Regulatory T Cells [WWW Document]. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2019.10.012>
- Historique : de Pie Noire à Prim'Holstein | Prim'Holstein France [WWW Document], n.d. URL <https://primholstein.com/la-prim-holstein/historique/> (accessed 1.5.23).
- Hynes, R.O., 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673–687. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00971-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00971-6)
- ITGB7 Gene - GeneCards | ITGB7 Protein | ITGB7 Antibody [WWW Document], 2020. URL <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ITGB7> (accessed 3.27.23).
- ITGB7 integrin subunit beta 7 [*Bos taurus* (cattle)] - Gene - NCBI [WWW Document], 2020. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/514031> (accessed 5.31.23).
- ITGB7 protein expression summary - The Human Protein Atlas [WWW Document], n.d. URL <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000139626-ITGB7> (accessed 3.30.23).
- Jacinto, J.G.P., Häfliger, I.M., Gentile, A., Drögemüller, C., Bolcato, M., 2021. A 6.7 kb deletion in the COL2A1 gene in a Holstein calf with achondrogenesis type II and perosomus elumbis. *Anim. Genet.* 52, 244–245. <https://doi.org/10.1111/age.13033>
- Kadri, N.K., Sahana, G., Charlier, C., Iso-Touru, T., Guldbandsen, B., Karim, L., Nielsen, U.S., Panitz, F., Aamand, G.P., Schulman, N., Georges, M., Vilkkki, J., Lund, M.S., Druet, T., 2014. A 660-Kb

- Deletion with Antagonistic Effects on Fertility and Milk Production Segregates at High Frequency in Nordic Red Cattle: Additional Evidence for the Common Occurrence of Balancing Selection in Livestock. *PLOS Genet.* 10, e1004049.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004049>
- La race Holstein – Holstein Switzerland, n.d. URL <https://www.holstein.ch/fr/qui-sommes-nous/la-race-holstein/> (accessed 10.14.22).
- Labatut, J., Tesnière, G., 2020. Chapitre 7 - La race bovine Holstein, institution de la modernisation de l'agriculture entre bien marchand et bien commun, in: Allaire, G., Daviron, B. (Eds.), Transformations agricoles et agroalimentaires : Entre écologie et capitalisme, Synthèses. Éditions Quæ, Versailles, pp. 133–149.
- Lf, B., N, B., F, D., Hr, O., M, A., F, P., Ap, S., Cf, B., F, M., 2021. Review: Genetic selection of high-yielding dairy cattle toward sustainable farming systems in a rapidly changing world. *Anim. Int. J. Anim. Biosci.* 15 Suppl 1. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100292>
- Liesveld, 2022. Production et fonction des éosinophiles - Hématologie et oncologie [WWW Document]. Édition Prof. Man. MSD. URL <https://www.msmanuals.com/fr/professional/h%C3%A9matologie-et-oncologie/pathologies-%C3%A9osinophiliques/production-et-fonction-des-%C3%A9osinophiles> (accessed 7.18.23).
- Luo, Q., Hou, C., Bai, Y., Wang, R., Liu, J., 2016. Protein Assembly: Versatile Approaches to Construct Highly Ordered Nanostructures. *Chem. Rev.* 116, 13571–13632.  
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00228>
- McNeilly, T.N., Naylor, S.W., Mitchell, M.C., McAteer, S., Mahajan, A., Smith, D.G.E., Gally, D.L., Low, J.C., Huntley, J.F., 2007. Simple methods for measurement of bovine mucosal antibody responses in vivo. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 118, 160–167.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.04.016>
- Mezu-Ndubuisi, O.J., Maheshwari, A., 2021. The role of integrins in inflammation and angiogenesis. *Pediatr. Res.* 89, 1619–1626. <https://doi.org/10.1038/s41390-020-01177-9>
- MGI-Mouse Phenotypes, Alleles & Disease Models [WWW Document], n.d. URL <https://www.informatics.jax.org/phenotypes.shtml> (accessed 2.23.23).
- Miglior, F., Fleming, A., Malchiodi, F., Brito, L.F., Martin, P., Baes, C.F., 2017. A 100-Year Review: Identification and genetic selection of economically important traits in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 100, 10251–10271. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12968>
- Observatoire National des Anomalies Bovines - BLAD [WWW Document], n.d. URL <https://www.onab.fr/Anomalies-identifiees/BLAD> (accessed 3.27.23).
- Observatoire National des Anomalies Bovines - Déclarer une anomalie [WWW Document], 2022. URL <https://www.onab.fr/Declarer-une-anomalie> (accessed 7.18.23).
- Observatoire National des Anomalies Bovines - Vers l'identification de la mutation causale [WWW Document], 2012. URL <https://www.onab.fr/Test-genetique/Vers-l-identification-de-la-mutation-causale> (accessed 6.19.23).
- Overeem, A.W., Posovszky, C., Rings, E.H.M.M., Giepmans, B.N.G., van IJzendoorn, S.C.D., 2016. The role of enterocyte defects in the pathogenesis of congenital diarrheal disorders. *Dis. Model. Mech.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.1242/dmm.022269>
- Présentation sur les affections héréditaires bovines, n.d.
- Prim'Holstein France | Association française des éleveurs de la race Prim'holstein [WWW Document], 2023. URL <https://primholstein.com/> (accessed 1.26.23).
- Pryce, J.E., Hayes, B.J., Goddard, M.E., 2012. Novel strategies to minimize progeny inbreeding while maximizing genetic gain using genomic information. *J. Dairy Sci.* 95, 377–388.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2011-4254>
- Reinartz, S., Hartmut, M., Surie, C., 2017. Germline mutation within COL2A1 associated with lethal chondrodysplasia in a polled Holstein family. *BMC Genomics.*  
<https://doi.org/10.1186/s12864-017-4153-0>

- Rivera-Nieves, J., Olson, T., Bamias, G., Bruce, A., Solga, M., Knight, R.F., Hoang, S., Cominelli, F., Ley, K., 2005. L-selectin, alpha 4 beta 1, and alpha 4 beta 7 integrins participate in CD4+ T cell recruitment to chronically inflamed small intestine. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 2343–2352. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.4.2343>
- Robert-Granié, C., Legarra, A., Ducrocq, V., 2011. Principes de base de la sélection génomique. *INRAE Prod. Anim.* 24, 331–340. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2011.24.4.3265>
- Rodrigues, C.H.M., Myung, Y., Pires, D.E.V., Ascher, D.B., 2019. mCSM-PPI2: predicting the effects of mutations on protein–protein interactions. *Nucleic Acids Res.* 47, W338–W344. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz383>
- Shahzad, K., Loor, J.J., 2012. Application of Top-Down and Bottom-up Systems Approaches in Ruminant Physiology and Metabolism. *Curr. Genomics* 13, 379–394. <https://doi.org/10.2174/138920212801619269>
- Sharma, P., Sharma, A., Srivastava, M., 2017. In vivo neutralization of  $\alpha 4$  and  $\beta 7$  integrins inhibits eosinophil trafficking and prevents lung injury during tropical pulmonary eosinophilia in mice. *Eur. J. Immunol.* 47, 1501–1512. <https://doi.org/10.1002/eji.201747086>
- Sun, H., Kuk, W., Rivera-Nieves, J., Lopez-Ramirez, M.A., Eckmann, L., Ginsberg, M.H., 2020.  $\beta 7$  Integrin Inhibition Can Increase Intestinal Inflammation by Impairing Homing of CD25hiFoxP3+ Regulatory T Cells. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 369–385. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2019.10.012>
- The Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium, Elsik, C.G., Tellam, R.L., Worley, K.C., Gibbs, R.A., Muzny, D.M., Weinstock, G.M., Adelson, D.L., Eichler, E.E., Elnitski, L., Guigó, R., Hamernik, D.L., Kappes, S.M., Lewin, H.A., Lynn, D.J., Nicholas, F.W., Reymond, A., Rijnkels, M., Skow, L.C., Zdobnov, E.M., Schook, L., Womack, J., Alioto, T., Antonarakis, S.E., Astashyn, A., Chapple, C.E., Chen, H.-C., Chrast, J., Câmara, F., Ermolaeva, O., Henrichsen, C.N., Hlavina, W., Kapustin, Y., Kiryutin, B., Kitts, P., Kokocinski, F., Landrum, M., Maglott, D., Pruitt, K., Sapojnikov, V., Searle, S.M., Solovyev, V., Souvorov, A., Ucla, C., Wyss, C., Anzola, J.M., Gerlach, D., Elhaik, E., Graur, D., Reese, J.T., Edgar, R.C., McEwan, J.C., Payne, G.M., Raison, J.M., Junier, T., Kriventseva, E.V., Eyas, E., Plass, M., Donthu, R., Larkin, D.M., Reecy, J., Yang, M.Q., Chen, L., Cheng, Z., Chitko-McKown, C.G., Liu, G.E., Matukumalli, L.K., Song, J., Zhu, B., Bradley, D.G., Brinkman, F.S.L., Lau, L.P.L., Whiteside, M.D., Walker, A., Wheeler, T.T., Casey, T., German, J.B., Lemay, D.G., Maqbool, N.J., Molenaar, A.J., Seo, S., Stothard, P., Baldwin, C.L., Baxter, R., Brinkmeyer-Langford, C.L., Brown, W.C., Childers, C.P., Connelley, T., Ellis, S.A., Fritz, K., Glass, E.J., Herzig, C.T.A., Iivanainen, A., Lahmers, K.K., Bennett, A.K., Dickens, C.M., Gilbert, J.G.R., Hagen, D.E., Salih, H., Aerts, J., Caetano, A.R., Dalrymple, B., Garcia, J.F., Gill, C.A., Hiendleder, S.G., Memili, E., Spurlock, D., Williams, J.L., Alexander, L., Brownstein, M.J., Guan, L., Holt, R.A., Jones, S.J.M., Marra, M.A., Moore, R., Moore, S.S., Roberts, A., Taniguchi, M., Waterman, R.C., Chacko, J., Chandrabose, M.M., Cree, A., Dao, M.D., Dinh, H.H., Gabisi, R.A., Hines, S., Hume, J., Jhangiani, S.N., Joshi, V., Kovar, C.L., Lewis, L.R., Liu, Yih-shin, Lopez, J., Morgan, M.B., Nguyen, N.B., Okwuonu, G.O., Ruiz, S.J., Santibanez, J., Wright, R.A., Buhay, C., Ding, Y., Dugan-Rocha, S., Herdandez, J., Holder, M., Sabo, A., Egan, A., Goodell, J., Wilczek-Boney, K., Fowler, G.R., Hitchens, M.E., Lozado, R.J., Moen, C., Steffen, D., Warren, J.T., Zhang, J., Chiu, R., Schein, J.E., Durbin, K.J., Havlak, P., Jiang, H., Liu, Yue, Qin, X., Ren, Y., Shen, Y., Song, H., Bell, S.N., Davis, C., Johnson, A.J., Lee, S., Nazareth, L.V., Patel, B.M., Pu, L.-L., Vattathil, S., Williams, R.L., Curry, S., Hamilton, C., Sodergren, E., Wheeler, D.A., Barris, W., Bennett, G.L., Eggen, A., Green, R.D., Harhay, G.P., Hobbs, M., Jann, O., Keele, J.W., Kent, M.P., Lien, S., McKay, S.D., McWilliam, S., Ratnakumar, A., Schnabel, R.D., Smith, T., Snelling, W.M., Sonstegard, T.S., Stone, R.T., Sugimoto, Y., Takasuga, A., Taylor, J.F., Van Tassell, C.P., MacNeil, M.D., Abatepaulo, A.R.R., Abbey, C.A., Ahola, V., Almeida, I.G., Amadio, A.F., Anatriello, E., Bahadue, S.M., Biase, F.H., Boldt, C.R., Carroll, J.A., Carvalho, W.A., Cervelatti, E.P., Chacko, E., Chapin, J.E., Cheng, Y., Choi, J., Colley, A.J., de Campos, T.A., De Donato, M., Santos, I.K.F. de M., de Oliveira, C.J.F., Deobald, H., Devinoy, E., Donohue, K.E., Dovc, P., Eberlein, A., Fitzsimmons, C.J., Franzin, A.M., Garcia, G.R., Genini, S., Gladney,



- C.J., Grant, J.R., Greaser, M.L., Green, J.A., Hadsell, D.L., Hakimov, H.A., Halgren, R., Harrow, J.L., Hart, E.A., Hastings, N., Hernandez, M., Hu, Z.-L., Ingham, A., Iso-Touru, T., Jamis, C., Jensen, K., Kapetis, D., Kerr, T., Khalil, S.S., Khatib, H., Kolbehdari, D., Kumar, C.G., Kumar, D., Leach, R., Lee, J.C.-M., Li, C., Logan, K.M., Malinverni, R., Marques, E., Martin, W.F., Martins, N.F., Maruyama, S.R., Mazza, R., McLean, K.L., Medrano, J.F., Moreno, B.T., Moré, D.D., Muntean, C.T., Nandakumar, H.P., Nogueira, M.F.G., Olsaker, I., Pant, S.D., Panzitta, F., Pastor, R.C.P., Poli, M.A., Poslusny, N., Rachagani, S., Ranganathan, S., Razpet, A., Riggs, P.K., Rincon, G., Rodriguez-Osorio, N., Rodriguez-Zas, S.L., Romero, N.E., Rosenwald, A., Sando, L., Schmutz, S.M., Shen, L., Sherman, L., Southey, B.R., Lutzow, Y.S., Sweedler, J.V., Tammen, I., Telugu, B.P.V.L., Urbanski, J.M., Utsunomiya, Y.T., Verschoor, C.P., Waardenberg, A.J., Wang, Z., Ward, R., Weikard, R., Welsh, T.H., White, S.N., Wilming, L.G., Wunderlich, K.R., Yang, J., Zhao, F.-Q., 2009. The Genome Sequence of Taurine Cattle: A Window to Ruminant Biology and Evolution. *Science* 324, 522–528. <https://doi.org/10.1126/science.1169588>
- Thiry, E., Schynts, F., Lemaire, M., 2002. Caractéristiques du système immunitaire du fœtus bovin et du veau nouveau-né. Implications dans la prévention et le diagnostic des infections d'origine virale.
- VanRaden, P.M., Miller, R.H., 2006. Effects of Nonadditive Genetic Interactions, Inbreeding, and Recessive Defects on Embryo and Fetal Loss by Seventy Days. *J. Dairy Sci.* 89, 2716–2721. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72347-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72347-5)
- VanRaden, P.M., Olson, K.M., Null, D.J., Hutchison, J.L., 2011. Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes. *J. Dairy Sci.* 94, 6153–6161. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4624>
- Veauthier, B., Hornecker, J.R., 2018. Crohn's Disease: Diagnosis and Management. *Am. Fam. Physician* 98, 661–669.
- Verschoor, C., Lelic, A., Bramson, J., Bowdish, D., 2015. An Introduction to Automated Flow Cytometry Gating Tools and Their Implementation. *Front. Immunol.* 6, 380. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00380>
- Vlasova, A.N., Saif, L.J., 2021. Bovine Immunology: Implications for Dairy Cattle. *Front. Immunol.* 12.
- von Andrian, U.H., Engelhardt, B., 2003.  $\alpha 4$  Integrins as Therapeutic Targets in Autoimmune Disease. *N. Engl. J. Med.* 348, 68–72. <https://doi.org/10.1056/NEJMe020157>
- Wagner, N., Löhler, J., Kunkel, E.J., Ley, K., Leung, E., Krissansen, G., Rajewsky, K., Müller, W., 1996. Critical role for  $\beta 7$  integrins in formation of the gut-associated lymphoid tissue. *Nature* 382, 366–370. <https://doi.org/10.1038/382366a0>
- Yu, Y., Zhu, J., Mi, L.-Z., Walz, T., Sun, H., Chen, J., Springer, T.A., 2012. Structural specializations of  $\alpha 4\beta 7$ , an integrin that mediates rolling adhesion. *J. Cell Biol.* 196, 131–146. <https://doi.org/10.1083/jcb.201110023>

ANNEXES :

Annexe 1 : Equivalence entre le périmètre thoracique et le poids vif en race Prim'Holstein

Tour de poitrine (en cm)	Poids vif (en kg)	Tour de poitrine (en cm)	Poids vif (en kg)	Tour de poitrine (en cm)	Poids vif (en kg)	Tour de poitrine (en cm)	Poids vif (en kg)
66	37	110	120	154	298	198	603
68	38	112	126	156	309	200	619
70	39	114	132	158	321	202	636
72	41	116	138	160	332	204	653
74	43	118	145	162	344	206	670
76	45	120	152	164	356	208	687
78	48	122	159	166	368	210	703
80	51	124	166	168	381	212	720
82	54	126	173	170	394	214	737
84	57	128	180	172	407	216	754
86	61	130	188	174	420	218	771
88	65	132	196	176	434	220	787
90	69	134	204	178	448	222	804
92	73	136	212	180	463	224	820
94	77	138	221	182	477	226	835
96	82	140	230	184	492	228	851
98	87	142	239	186	507	230	866
100	92	144	248	188	523	232	880
102	97	146	258	190	538	234	894
104	103	148	267	192	554	236	908
106	108	150	278	194	570		
108	114	152	288	196	586		

Annexe 2 : Script du discours standardisé énoncé aux éleveurs en premier contact

Bonjour Madame/Monsieur,

Adèle Clément, étudiante vétérinaire à l'appareil. J'ai eu votre numéro via l'institut de l'INRAe qui est en relation avec votre centre de génotypage. Je vous contacte dans le cadre de ma thèse vétérinaire. En effet, j'étudie une mutation génétique dont une de vos vaches/génisses est porteuse. Nous avons eu cette information grâce aux données récoltées lors de la collecte de cartilage d'oreille pour l'établissement du potentiel génétique de vos génisses. Nous n'avons pas encore beaucoup d'information sur cette anomalie et j'aurai aimé savoir si vous seriez d'accord pour que je vienne chez vous faire un examen clinique et des prélèvements sanguins sur la génisse n° .... et sur une génisse de même âge qui servira de témoin. Ces données me serviraient dans le cadre de ma thèse et plus largement pour la recherche fondamentale à l'INRAe. A terme, le but est de comprendre l'anomalie, déterminer si elle est dangereuse et si oui éviter sa propagation. Je n'aurai besoin que d'une demi-heure sur place et d'un système de contention pour les animaux.

Annexe 3 : Questionnaire à l'éleveur lors de l'enquête terrain 2021

**QUESTIONS SUR LA CONDUITE D'ELEVAGE :**

1) Logement :

*Logette ou aire paillée ?*

*Ventilation ?*

*Surface par vache ?*

*Densité ?*

*Fréquence de paillage ?*

2) Alimentation :

*Ration par vache, mode de distribution (matin/soir ?), refus ?*

*Complémentation : complète /semi-complète ?*

*Appétit des différents lots ?*

*Pâturage ? quelle durée ?*

3) Reproduction :

*Âge / mode de sevrage ?*

*Départ des veaux : vente/renouvellement ?*

*Taureau reproducteur/ IA ?*

*IVV moyen ? Nombre d'IA par vache en moyenne ?*

**QUESTIONS SUR LES ANTECEDENTS PATHO :**

1) Problèmes endémiques ? *de l'année 2020 ou plus, boiteries ? saisies de carcasse ? repro ?*

2) Problème individuel de la génisse mutée ?

3) Traitements systématiques/préventifs ? *API/ APE ? fréquence, molécule*

Annexe 4 : Formulaire de déclaration d'anomalie version 2022 également disponible en ligne à <http://limesurvey42.idele.fr/index.php/285131?lang=fr> ("Observatoire National des Anomalies Bovines - Déclarer une anomalie," 2022)

### 1. ORIGINE DU QUESTIONNAIRE

Ces questions permettent de situer géographiquement l'animal porteur d'anomalie, ainsi que l'organisme et la personne qui remplit la fiche, pour la recontacter **afin d'accuser réception des prélèvements** et si besoin, obtenir plus d'informations sur l'anomalie déclarée.

Fiche remplie par : ..... Le : ..... / ..... / .....

Profession ou type d'organisme d'appartenance du déclarant :

- |  |  |
|--|--|
| <input type="radio"/> CIA                                      | <input type="radio"/> Vétérinaire praticien                      |
| <input type="radio"/> Eleveur/Eleveuse                         | <input type="radio"/> Vétérinaire de <b>GDS</b> ou de Groupement |
| <input type="radio"/> Technicien.ne d'Organisme de Sélection   | <input type="radio"/> Autre, précisez : .....                    |
| <input type="radio"/> Technicien.ne de contrôle de performance | <input type="radio"/> <b>Num déclarant</b> : .....               |

Mail du déclarant : ..... et/ou: Téléphone .....

Nom du propriétaire de l'animal (seul propriétaire des prélèvements envoyés) : .....

N° de cheptel EDE : ..... (8 chiffres)

Le/les prélèvement/s sera/seront utilisé/s à des fins de recherches pour identifier les facteurs génétiques en cause dans l'anomalie pour laquelle il/s est/sont prélevé/s (en aucun cas pour la consommation humaine)

### 2. IDENTIFICATION DE L'ANIMAL PORTEUR

N° national de l'animal porteur de l'anomalie : ..... Race : .....

Sexe :  Mâle  Femelle  Intersexué  Non vérifié Date de naissance : .....

N° national de la mère : ..... Race : .....

N° national du père : ..... Race : .....

Date de mort : .....  Euthanasié ?  Mort-né ?  Avortement ?

Naissance multiple :  Jumeau  Triplé  Autre, précisez : .....

Conditions de vêlage :  Sans aide  Facile, Avec aide  Difficile  Césarienne  Extraction de l'embryon

### 3. ALLURE GENERALE ET DEVELOPPEMENT DE L'ANIMAL

Si l'anomalie n'était pas visible à la naissance, quel était l'âge :

D'apparition des symptômes (précisez si vous parlez de mois ou de jours) : .....

De l'animal quand il a été vu par le vétérinaire (précisez si vous parlez de mois ou de jours) .....

Si l'animal présente un développement anormal, quel est-il ?

- |   |   |
|---|---|
| <input type="radio"/> Nain                                | <input type="radio"/> Beaucoup plus chétif que la normale         |
| <input type="radio"/> Beaucoup plus petit que la normale  | <input type="radio"/> Largement plus musclé que la normale        |
| <input type="radio"/> Largement plus grand que la normale | <input type="radio"/> Amyotrophie (Faible ou absence musculature) |

**Monstruosités :**

- Jumeaux conjoints (monstre double)  Anidien (Masse sphérique recouverte de poils)  
 Coelosomien (tous les viscères à l'air, enveloppe non terminée)  Hydropisie (amas d'eau dans tout le corps)  
 Anasarque (abdomen gonflé, peau très fine)  Autre type de monstre : .....

**4. AVEZ-VOUS QUELQUE-CHOSE A SIGNALER SUR LES MUQUEUSES, LES POILS ET/OU LA PEAU ?**  Oui  Non

Si la réponse est NON, ne pas remplir la partie ci-dessous

**Problème situé au niveau de la peau :**

- Plaie ouverte de la peau (ulcère)  Tumeur  
 Zones de démangeaisons, peau qui suinte (prurit)  Peau qui se détache  
 Défaut de pigmentation de la peau, **précisez** : .....  Autre : .....

**Problème situé au niveau des muqueuses :**  Ulcérées  Anémie, couleur .....

Autres, précisez : .....

**Localisation du problème des muqueuses :**  Mufle  Conjonctive  Anus  Muqueuse génitale

**Problème situé au niveau des poils :**  Absence de poils  Poils crépus ou ébouriffés

Défaut de pigmentation des **poils**, précisez : .....

Autre problème au niveau des **poils**, précisez : .....

**5. AVEZ-VOUS QUELQUE-CHOSE A SIGNALER AU NIVEAU DE LA TÊTE OU DU COU DE L'ANIMAL ?**  Oui  Non

Si la réponse est NON, ne pas remplir la partie ci-dessous

**La tête est :**  Trop large  Trop allongée/fine  Très asymétrique  Autre, précisez:.....

**Le crâne est :**  avec une hernie molle de la boîte crânienne  absent  trop réduit

trop gros, en forme de dôme  Autre, précisez: .....

**L'animal est-il aveugle ?**  Oui  Non

**Globes oculaires :**  Normaux  Anormaux  Absents  Autre, précisez : .....

**Autres anomalies des yeux :**

Tâche blanche sur la surface de l'œil  Tremblement des yeux

Yeux exorbités  Problème de vision de nuit

Autre, précisez: .....

**Anomalie des oreilles :**

Plus de deux oreilles (précisez le nombre) : .....  Positionnement anormal des oreilles, précisez : .....

Forme / taille anormale des oreilles, précisez : .....  Autre, précisez: .....

**La bouche (lèvres, dents, langue) présente une anomalie :**

- Fente(s) du palais     Lèvre inférieure fendue     Lèvre supérieure fendue     Langue trop grosse  
 Langue trop petite     Ulcères buccaux     Perte de dents     Salive beaucoup  
 Difficultés à boire     Difficultés à manger     Autre, précisez: .....

**Les mâchoires présentent une anomalie :**

De la mâchoire supérieure, précisez : .....  De la mâchoire inférieure, précisez : .....

**L'animal mufle présente une anomalie :**

- Narine fendue    **Si oui**     Gauche     Droite     Les deux  
 Occlusion partielle ou totale des narines     Autre, précisez : .....

**Le cou présente une anomalie :**  Très épais  Tordu, déformé  Trop court  Trop long  Absent  Dédoublé

**Autres anomalies de la tête ou du cou, à préciser :** .....

**6. AVEZ VOUS QUELQUE-CHOSE A SIGNALER AU NIVEAU DU CORPS DE L'ANIMAL ?**     Oui     Non

**Si la réponse est NON, ne pas remplir la partie ci-dessous**

**Anomalies de la colonne vertébrale :**  voûtée/bossue     ensellée/creusée     tordue (scoliose)  
 Défaut de fermeture, si oui localisation : .....  Dédoublement, si oui localisation : .....

**Anomalies de la queue :**  Absence totale  Absence partielle  Déformée  En tire-bouchon  Attachée sur le dos  
 Autre, précisez : .....

**Anomalies des épaules :**  Trop larges     Trop étroites     Autre, précisez .....  
**Anomalies des hanches :**  Trop larges     Trop étroites     Autre, précisez : .....

**Anomalies de l'abdomen :**  Abdomen anormalement gonflé (veau non vidé)  Présence d'œdème  
 Hernie ombilicale  Hernie abdominale     Viscères apparents     Autre, précisez : .....

**Anomalies de l'anus\* :**  absent (pas de perforation)  présent, non fonctionnel : absence de selles  mal positionné  
 Autre, précisez : .....

*\* Pour les déclarations d'atrésie, toujours préciser si l'anus est présent ou pas, puis indiquer dans "autre anomalie du corps" qu'il s'agit d'une atrésie **uniquement si une autopsie a été réalisée***

**Anomalies de l'appareil génital masculin :**  Pénis absent     Pénis mal positionné  
 Testicules, précisez le nombre si différent de 2 : .....  
 Passage d'organes abdominaux dans les bourses testiculaires  Autre, précisez : .....

**Anomalies de l'appareil génital femelle :**  Vulve absente  Vulve mal positionnée  Vulve malformée  
 Clitoris hypertrophié  Autre, précisez : .....

**Anomalies de la mamelle :**  Trayon surnuméraire bien développé : précisez le nombre : .....

Absence de mamelle  Absence de trayon

**Autre anomalie du corps, précisez :** .....

**7. AVEZ-VOUS UNE ANOMALIE DES MEMBRES A SIGNALER ?**

Oui  Non

**Si la réponse est NON, ne pas remplir la partie ci-dessous**

**Description des membres anormaux (dont problèmes d'articulations) :** *Toujours préciser la localisation du ou des membres atteints (antérieur droit/gauche, postérieur droit/gauche)*

Absence de membre(s), le(s)quel(s) : .....

Moignon, localisation(s)  antérieur D  antérieur G  postérieur D  postérieur G

Membre(s) surnuméraire(s); le(s)quel(s) : .....

Autre, précisez : .....

**Autres anomalies des membres :** .....

**Description des articulations déformées :**

Nature de la déformation : .....

Localisation de la déformation :  antérieur D  antérieur G  postérieur D  postérieur G

Anomalie des articulations autre qu'une déformation, précisez : .....

**Anomalies des onglons :**

Onglons surnuméraires :  antérieur D  antérieur G  postérieur D  postérieur G

Onglons soudés :  antérieur D  antérieur G  postérieur D  postérieur G

Pas d'onglon :  antérieur D  antérieur G  postérieur D  postérieur G

Autre, précisez : .....

**8. L'ANIMAL PRESENTE-T-IL DES TROUBLES DE COMPORTEMENT OU DE LA CONSCIENCE ?**  Oui  Non

**Si la réponse est NON, ne pas remplir la partie ci-dessous**

Tremblements  Tourne en rond  Tourne toujours du même côté  Epilepsie

Reste parfois la tête en l'air à la verticale  Paralyse, incapable de bouger  Immobilité, indifférence

Ataxie et autres troubles de la locomotion (incoordination locomotrice, titube, arrière train qui s'affaisse...),  
précisez : .....  Autre : .....

**9. ENVIRONNEMENT SANITAIRE** *Ces questions non obligatoires sont posées strictement à titre informatif, afin de pouvoir analyser au mieux l'origine de l'anomalie déclarée*

**Premier cas d'anomalie dans l'exploitation ?**  Oui  Non

**Précisez s'il y a eu un diagnostic récent de pathologie (FCO, BVD, Schmallerberg...) dans l'exploitation** (nom de la pathologie + date du passage) .....

**Pathologies contractées par la mère pendant la gestation ?** .....

**Nom des traitements médicamenteux éventuels sur la mère pendant la gestation**

.....

**10. AVEZ-VOUS UNE HYPOTHESE SUR L'ANOMALIE ?**





## RESUME

La surutilisation de taureaux stars au cours du XXème siècle a appauvri la diversité génétique au sein des cheptel. En conséquence, l'élevage laitier fait aujourd'hui face à une nouvelle problématique : la gestion des anomalies génétiques. Par génétique inverse, l'INRAe et l'ONAB ont découvert l'existence d'une anomalie sur le gène ITGB7 en race Prim'Holstein responsable du syndrome BLIRD.

L'objectif de ce travail de thèse est de décrire la physiopathologie associée à cette mutation récessive au travers d'une enquête terrain suivant 40 animaux homozygotes. Pour cela, des examens cliniques, des mesures de poids et des analyses sanguines ont été réalisés.

Cette étude a permis la mise en évidence d'un retard de croissance important ainsi qu'une leucocytose majeure chez les individus atteints. La pathogénie n'a pas été clairement définie. La non-valeur économique de ces animaux justifie l'éradication progressive de l'anomalie en conseillant aux éleveurs de faire des accouplements raisonnés.

## ABSTRACT

During the 20th century, overusing star bulls has drastically depleted genetic diversity within livestock herds. Consequently, dairy farms now face a new problematic : monitoring genetic anomalies. Using reverse genetics, INRAe and ONAB discovered an anomaly on the ITGB7 gene in Holstein cows which causes BLIRD syndrome.

The aim of this thesis is to describe the physiopathology of this recessive mutation through a field investigation on 40 homozygous animals. To do so, clinical examinations, weight measures and blood analyses were conducted.

This study highlights a major growth delay and a severe leukocytosis in affected individuals . Pathogeny hasn't clearly been described. The non-economic value of these animals justifies the gradual eradication of the anomaly by encouraging farmers to do adequate breeding.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'AM' with a stylized flourish underneath.