

J. C. Maillard<sup>1</sup>S. J. Kemp<sup>3</sup>H. Leveziel<sup>2</sup>A. J. Teale<sup>3</sup>R. Quéval<sup>1</sup>

# Le complexe majeur d'histocompatibilité de bovins ouest africains. Typage d'antigènes lymphocytaires (BoLA) de taurins Baoulé (*Bos taurus*) et de zébus Soudaniens (*Bos indicus*) du Burkina Faso (Afrique Occidentale)

MAILLARD (J. C.), KEMP (S. J.), LEVEZIEL (H.), TEALE (A. J.), QUÉVAL (R.). Le complexe majeur d'histocompatibilité de bovins ouest africains. Typage d'antigènes lymphocytaires (BoLA) de taurins Baoulé (*Bos taurus*) et de zébus Soudaniens (*Bos indicus*) du Burkina Faso (Afrique Occidentale). *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 1989, 42 (2) : 275-281.

Le typage des antigènes lymphocytaires (BoLA) chez 247 taurins Baoulé (*Bos taurus*) et 106 zébus Soudaniens (*Bos indicus*), a permis de déterminer les fréquences géniques de 43 spécificités de classe 1, aussi bien officielles mondiales « W » et européennes « EU », que locales africaines du Kenya « KN » et du Burkina Faso « BF ». La comparaison de ces fréquences met en évidence le fait que certaines de ces spécificités peuvent être considérées comme des marqueurs significatifs de races taurine Baoulé et zébu. *Mots clés* : Bovin Baoulé - Zébu - Marqueur génétique - Antigène lymphocytaire - Burkina Faso.

## INTRODUCTION

Issues de l'étude expérimentale des phénomènes de transplantations et de rejets de greffes, les recherches sur les systèmes d'histocompatibilité connaissent depuis plusieurs années, un développement très important.

Les modèles humain (HLA) et murin (H-2) furent les premiers décrits et sont actuellement les mieux connus. Ils permirent de donner une définition générale, selon laquelle on désigne par Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), un segment chromosomique portant un ensemble de gènes, fonctionnellement et topographiquement liés, codant pour des antigènes présents sur les cellules nucléées de l'individu, intervenant entre autres dans divers mécanismes fondamentaux de l'immunologie. Ce complexe occupe environ 1/1000<sup>e</sup> du génome entier avec une fréquence de recombinaison d'environ 1 p.100. Le chromosome porteur varie selon l'espèce (6 chez l'homme, 7 chez le

porc, 17 chez la souris et 23 chez le bovin), ainsi que l'agencement structurel. En général, on peut dire qu'il existe 2 classes de gènes codant différents antigènes lymphocytaires ; chaque classe ayant un nombre de spécificités, une structure moléculaire et un rôle immunologique différents :

— **Les gènes de classe 1** codent des antigènes très polymorphes, présents sur toutes les cellules nucléées de l'organisme dont les lymphocytes du sang périphérique. Ils conditionneraient les mécanismes de l'immunité à médiation cellulaire.

— **Les gènes de classe 2** codent des antigènes également très polymorphes, présents surtout sur les lymphocytes B, mais absents de la majorité des cellules T. Outre la réaction mixte lymphocytaire, ils contrôleraient en grande partie la réponse immunitaire humorale.

Au niveau des lymphocytes, ces antigènes régulent donc la réponse immunitaire (10) et influencent la sensibilité aux maladies (2, 12, 16).

Chez les bovins, les recherches sur le CMH se sont développées d'abord en Occident (3, 4, 8, 14, 17) puis dans le reste du monde y compris en Afrique (6, 15, 18). La coopération entre plusieurs équipes internationales ainsi que des réunions de travail ont contribué à mieux définir ces antigènes lymphocytaires des bovins (BoLA) (1, 7, 9, 11, 13).

Le premier objectif fut la caractérisation des antigènes de classe 1, contre lesquels sont dirigés des anticorps cytotoxiques dont l'obtention est relativement aisée. Plusieurs travaux de comparaisons internationales ont mis en évidence un certain nombre de spécificités officielles « W », qui se dédoublent de plus en plus en sous-spécificités. De plus, un certain nombre de spécificités dites « locales » ont été décrites dans divers pays du monde entier. Chez les bovins, ces antigènes de classe 1 se situent sur un locus A, mais la présence d'un deuxième locus B semble de plus en plus probable, vu le nombre de spécificités reconnues chez certains individus.

Le CMH des bovins est comparable à celui des autres espèces mammifères. Certaines corrélations avec des maladies sont apparues, mais très peu encore avec des caractères zootechniques.

1. Service Immunogénétique du Centre de Recherche sur les Trypanosomoses Animales (CRTA), 01 B.P. 454, Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso.

2. Laboratoire de Génétique Biochimique, INRA-CRZ, 78350 Jouy-en-Josas, France.

3. International Laboratory for Research on Animal Diseases (ILRAD), P.O. Box 30709, Nairobi, Kenya.

Reçu le 13.04.89, accepté le 25.05.89.

## MATÉRIEL ET MÉTHODE

### Matériel animal

Aussi bien pour la production de réactifs que pour les typages lymphocytaires, deux races bovines, courantes au Burkina Faso, ont été utilisées :

— des zébus (*Bos indicus*) de type sahélo-soudanien provenant de plusieurs régions de l'ensemble du territoire ;

— des taurins (*Bos taurus*) courtes cornes de race Baoulé, provenant des régions Sud et Sud-Ouest du pays.

L'ensemble du troupeau expérimental était constitué de 353 bovins répartis en 247 taurins Baoulé et 106 zébus, de tous âges, des deux sexes, très peu apparentés du fait de l'hétérogénéité géographique originelle, et entretenus pendant deux années en stabulation, dans les mêmes conditions sanitaires et environnementales au ranch de Banankéléda.

### Production de réactifs

#### Principe

La reconnaissance des antigènes de classe 1 dépend essentiellement de la production de bons réactifs lymphocytotoxiques dirigés monospécifiquement contre eux, et pouvant être obtenus de différentes façons :

— sérums foeto-maternels, contenant des anticorps naturels cytotoxiques contre les antigènes de l'haplo-type du père, et absents de celui de la mère. En général, les titres en sont faibles, et chez les multipares, ces sérums sont très polyspécifiques, donc nécessitant un gros travail de purification. De plus les titres en sont souvent peu élevés.

— Sérums d'immunisations :

- . soit avec des lymphocytes purifiés
- . soit par greffe de peau

Les sérums obtenus ont des titres plus élevés et sont moins compliqués à purifier si l'on peut orienter le résultat en connaissant les haplotypes des donneurs et des receveurs.

#### Technique

L'étude a porté sur 87 sérums bruts, soit d'origine naturelle (foeto-maternelle), soit provenant de greffes

de peau mère-produit, obtenus à partir des animaux zébus et Baoulé de la ferme.

Il a alors été possible de purifier un certain nombre de ces sérums, après avoir jugé de leur qualité et de leur titres potentiels, en les testant tous sur un panel de 56 lymphocytes de référence connus (mission Leveziel 1985).

— 36 sérums furent donc éliminés, car trop complexes ou de titres trop faibles.

— 51 sérums furent purifiés (rendus monospécifiques), par diverses techniques : tableaux croisés et absorptions avec de grandes quantités de lymphocytes frais, ce qui fut facilité par le nombre et la proximité des animaux de référence.

### Résultats

Plusieurs sérums monospécifiques, de titres convenables détectant 15 spécificités ont été obtenus :

. 6 « W » mondialement reconnues :

W6-W7-W8-W10-W25 (=G=FJD1)-FJXX

. 9 « BF » (Burkina Faso) locales :

BF1-BF2-BF3-BF6-BF7-BF8-BF9-BF10-BF11

Tous ces sérums furent ensuite testés dans deux laboratoires de référence :

— CRZ-INRA de Jouy-en-Josas (France), au service de génétique biochimique du Dr LEVEZIEL, qui confirma la monospécificité et le bon titre de tous les sérums anti W, mais ne reconnut aucun sérum de spécificités locales « BF », ceci semblant confirmer leurs caractéristiques africaines.

— ILRAD de Nairobi (Kenya) au service des Drs TEALE et KEMP, qui confirmèrent également la bonne qualité des sérums anti W, et qui de plus reconnurent deux spécificités : KN 18 = FJXX et KN 4 = BF 9

### Typage lymphocytaire

#### Prélèvements

Les échantillons de sang nécessaires au typage lymphocytaire furent prélevés en tubes vacutainers sous vide (Venoject) de 20 ml avec comme anticoagulant, de l'héparine de sodium à 10 ui/ml de sang total, dans la veine jugulaire externe ou à l'artère caudale médiane. Pendant leur transport, les échantillons furent conservés en boîte isotherme.

## Technique

Les lymphocytes nécessaires au typage doivent être préalablement purifiés par centrifugation du sang total sur gradient de densité Ficoll-Paque (Pharmacia) (Boyum 1968). Ils sont alors utilisés frais, ou congelés en azote liquide pour des tests ultérieurs, avec 75 à 95 p. 100 de reviviscence.

Le typage est réalisé selon la technique standardisée du test de lymphocytotoxicité en boîte de Terasaki. Ce test s'effectue en mettant en contact pendant 30 mn à 23-25 °C, 1 µl d'antisérum monospécifique à la dilution appropriée, avec 1 µl de suspension lymphocytaire à 2 500 lymphocytes vivants/µl. Puis on ajoute 5 µl de complément de lapin (Buxted Rabbit Co Ltd, Sussex, TN22 4LR, England). Après 60 mn, on ajoute 2 µl d'éosine Y ou G à 5 p. 100 pendant 5 mn afin de colorer les lymphocytes tués. On arrête alors la réaction par ajout de 6 µl de formol pH = 7,4. Un témoin « négatif » de non-lyse lymphocytaire devra toujours être effectué.

La lecture du taux de mortalité des lymphocytes s'effectue au microscope inversé en contraste de phase. Les lymphocytes tués ont pris la coloration et apparaissent « sombres » alors que les lymphocytes vivants restent « clairs » et refringents. L'intensité de la réaction est estimée à 3 stades (Tabl. I).

TABLEAU I Stades d'intensité de la réaction.

P. 100 de lymphocytes tués	Réaction
0-50 p. 100	négative
50-80 p. 100	douteuse
80-100 p. 100	positive

## Traitement statistique des données (5)

### Fréquence phénotypique (FØ)

C'est le rapport du nombre d'animaux positifs (n) pour une spécificité antigénique donnée, sur le nombre total d'animaux testés (N) :

$$F\emptyset = n/N$$

### Fréquence génique Fg

La fréquence génique est calculée à partir de la fréquence phénotypique selon la formule de Baur et Danilovs (1980) :

$$Fg = 1 - \sqrt{1 - F\emptyset} = 1 - (1 - F\emptyset)^{0.5}$$

## Chi deux (X<sup>2</sup>)

C'est la valeur de comparaison d'un gène donné dans deux populations différentes. Pour que cette comparaison soit significative, le X<sup>2</sup> doit être supérieur à 3,841 pour un nombre de degrés de liberté égal à 2 avec une probabilité (seuil de signification observé) inférieure à 5 p. 100 (Tabl. II).

$$X^2 = \frac{[(a \times d) - (b \times c)]^2 \times N}{(a + b)(c + d)(a + c)(b + d)} > 3,841$$

Dans le cas où un gène donné présent dans une des deux populations est inférieur à 5 (d ou b < 5), il faut, pour rester significatif, appliquer la correction de Yates, selon la formule :

$$X^2 = \frac{[(a \times d) - (b \times c) - N/2]^2 \times N}{(a + b)(c + d)(a + c)(b + d)} > 3,841$$

## RÉSULTATS

Les 247 taurins Baoulé et les 106 zébus ont été typés sur la batterie de 15 spécificités du CRTA. Parmi ces animaux 65 taurins Baoulé et 14 zébus ont été retypés sur la batterie complète de L'ILRAD. Pour chaque spécificité, il a été calculé :

- les fréquences phénotypiques (FØ)
- les fréquences géniques (Fg)
- le Chi deux (X<sup>2</sup>)
- le degré de liberté
- le pourcentage de probabilité ou seuil de signification

Les fréquences géniques comparant les races taurine Baoulé et zébu sont présentées sous forme d'histogramme et sont regroupées par types de spécificités : officielles (W), européennes (EU), locales africaines du Kenya (KN) et du Burkina Faso (BF) (Fig. 1, 2, 3).

Il apparaît clairement que certaines spécificités présentent des différences de fréquences géniques très importantes.

L'ensemble de ces résultats semble confirmer en partie ceux déjà publiés sur les bovins africains (6, 15, 18).

Parmi ces 43 spécificités, celles qui sont statistiquement significatives, avec un X<sup>2</sup> > 3,84 pour 2 degrés

TABLEAU II

Nb de fois où un gène donné est :	présent	absent	Nb total d'individus de la population
Population 1	a	n1 - a = c	a + c = n1
Population 2	b	n2 - b = d	b + d = n2
	a + b	c + d	n1 + n2 = N (nb total d'animaux testés)

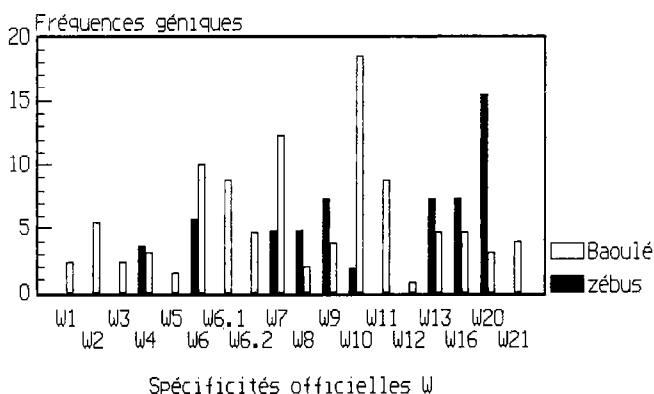


Fig. 1 : Fréquences génétiques de spécificités BoLA (classe 1) officielles « W » chez des zébus et des taurins Baoulé du Burkina Faso.

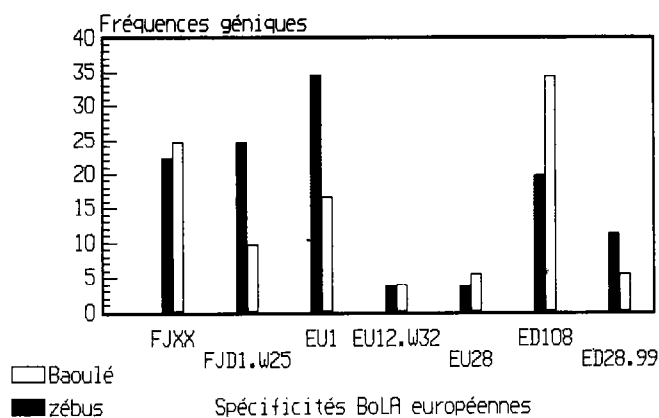


Fig. 2 : Fréquences génétiques de spécificités BoLA (classe 1) européennes « EU » chez des zébus et des taurins Baoulé du Burkina Faso.

de liberté et un seuil de signification inférieur à 5 p. 100, ont été regroupées dans un histogramme par ordre décroissant de Fg des spécificités « marqueurs » de taurins Baoulé et « marqueurs » de zébus (Fig. 4) (Tabl. III).

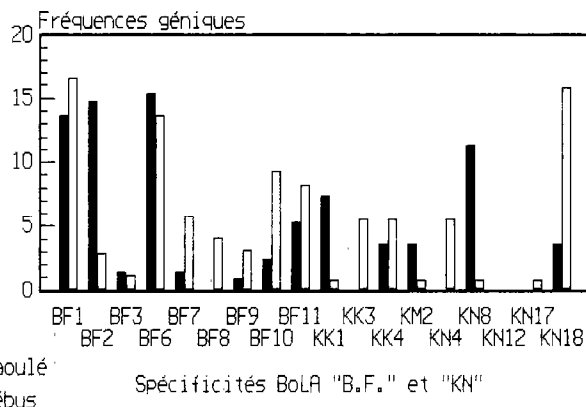


Fig. 3 : Fréquences génétiques de spécificités BoLA (classe 1) africaines du Burkina Faso « BF » et du Kenya « KN » chez des zébus et des taurins Baoulé du Burkina Faso.

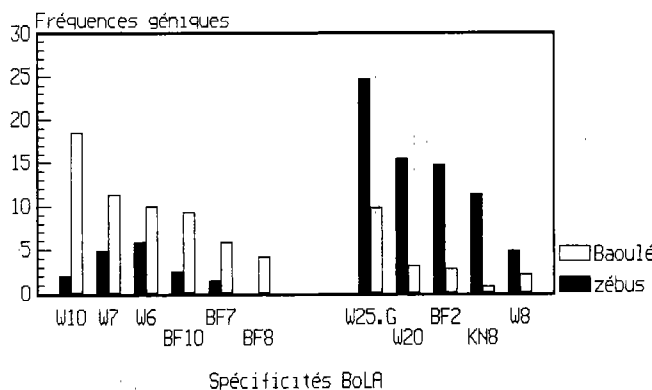


Fig. 4 : Gènes BoLA de classe 1 marqueurs significatifs de race chez des zébus et des taurins Baoulé du Burkina Faso.

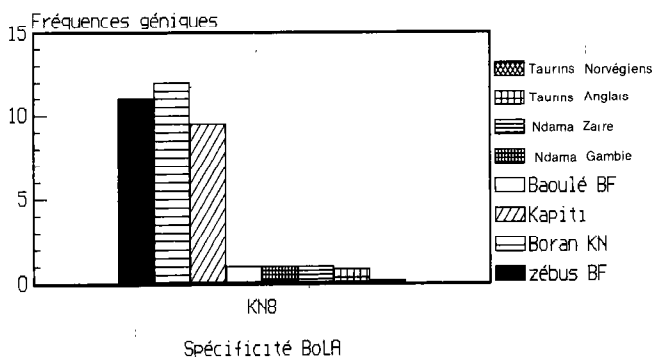


Fig. 5 : Répartition de la spécificité BoLA classe 1 : KN8 dans différentes populations bovines.

TABLEAU III Tableau statistique des spécificités BoLA classe I « marqueurs » de races taurine Baoulé et zébu.

Spécificités	Fg Baoulé	Fg zébu	Chi <sup>2</sup>	D.L.	Seuil sign.
W10	18,51	1,86	35,89	2	0,0000
W7	11,34	4,81	10,10	2	0,0064
W6	10,00	5,81	4,03	2	0,1332
BF10	9,33	2,37	10,85	2	0,0044
B F 7	5,81	1,40	5,68	1	0,0172
BF8	4,08	0	7,64	1	0,0057
W25 = G	9,77	24,70	14,13	2	0,0009
W20	3,09	15,44	4,13	1	0,0420
BF2	2,84	14,73	30,62	1	0,0000
KN8	0,75	11,34	5,79	1	0,0161
W8	2,02	4,81	4,74	2	0,0933

## DISCUSSION

### Marqueurs de race taurine Baoulé

La spécificité la plus intéressante semble être W10, car elle présente à la fois :

— la fréquence significative la plus élevée (Fg = 18,51) dans cette race,

— et la plus grande différence de fréquences avec l'autre race zébu ( $X^2 = 35,89$  avec un seuil de signification inférieur à 1 pour 10 000).

Ceci n'est pas surprenant car cette spécificité a déjà été signalée chez les races taurines européennes, américaines ou australiennes et chez le taurin africain N'Dama.

Quant aux autres spécificités « marqueurs » de Baoulé, elles restent intéressantes, bien que leurs fréquences soient plus faibles. En effet, elles peuvent avoir un rôle complémentaire dans d'éventuels programmes de recherche de métissage ou de sélection raciale. Il est à noter que la spécificité BF8 n'a jamais été trouvée chez les zébus.

### Marqueurs de race zébu

La spécificité dont la Fg est la plus importante est W25 qui se dénommait précédemment FJD1 ou G. Cependant cette fréquence proche de 25 p. 100 est aussi présente chez près de 10 p. 100 des Baoulé.

Deux autres spécificités semblent plus intéressantes :

— **BF2** qui présente à la fois une Fg proche de 15 p. 100, mais surtout une grande différence avec la race Baoulé, pour un  $X^2$  de 30,62 avec 1 degré de

liberté, et un seuil de signification inférieur à 1 pour 10 000.

— **KN8** qui est présente chez plus de 10 p. 100 des zébus, est pratiquement absente chez les taurins Baoulé. Ceci vient confirmer les chiffres signalés par l'équipe de l'ILRAD (6, 18) sur plusieurs populations de taurins européens et africains (N'Dama) et sur deux races de zébus d'Afrique de l'Est (Kapiti, Boran KN). Si l'on ajoute à ces données celles que l'on a sur cette autre race de taurins africains que sont les Baoulé, et sur une autre race de zébus d'Afrique de l'Ouest, il apparaît que cette spécificité est un excellent « marqueur » de zébu, quelle qu'en soit la race, par rapport aux races taurines, qu'elles soient européennes ou africaines (Fig. 5).

Il serait intéressant de typer cette spécificité KN8 chez d'autres races de zébus non africains.

## CONCLUSION

L'étude du BoLA est donc une contribution à la caractérisation de races bovines d'Afrique de l'Ouest, qu'il s'agisse de taurins Baoulé ou de zébus Soudanais du Burkina Faso, la pureté raciale semblant être un préalable indispensable à toute étude génétique.

Les variations de fréquences de ces différentes spécificités d'antigènes lymphocytaires très polymorphes, peuvent trouver plusieurs applications pratiques :

— comme moyen d'investigation, à l'intérieur de populations soumises à des conditions éco-géographiques variables, d'éventuelles relations avec des maladies ou des caractères de productions zootechniques :

J. C. Maillard, S. J. Kemp, H. Leveziel, A. J. Teale, R. Quéval

— comme marqueurs génétiques dans les programmes de sélection, de contrôles de filiations et de sauvegarde des races ;

— comme moyen de dépistage et d'évaluation des degrés de métissage de populations ou d'isolats.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions le Dr GRAY directeur de l'ILRAD de Nairobi (Kenya), qui a bien voulu accepter et encoura-

ger une coopération franche et sincère. Nous souhaitons qu'elle puisse encore se renforcer afin de continuer à oeuvrer dans cette même voie.

Ce travail a été réalisé avec le support financier de l'Institut d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux (IEMVT), département du Centre de Coopération Internationale en Recherches Agronomiques pour le Développement (CIRAD, France) et la Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ, République Fédérale d'Allemagne) PN7722275.

**MAILLARD (J. C.), KEMP (S. J.), LEVEZIEL (H.), TEALE (A. J.), QUÉVAL (R.).** The major histocompatibility complex of West African cattle. Lymphocyte antigens (BoLA) typing on Baoule taurines (*Bos taurus*) and Sudanian zebu (*Bos indicus*) in Burkina Faso (West Africa). *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1989, **42** (2) : 275-281.

Lymphocyte antigens (BoLA) typing on 247 Baoule taurines (*Bos taurus*) and 106 Sudanian zebu (*Bos indicus*), allowed to determine gene frequencies of 43 class I specificities, as international « W » and European « EU », as African local from Kenya « KN » and Burkina Faso « BF ». In comparing these frequencies, it appears that some specificities could be considered as significant breed markers for Baoule taurines and zebu. *Key words* : Baoule taurine - Zebu - Genetic marker - Lymphocyte antigen - Burkina Faso.

**MAILLARD (J. C.), KEMP (S. J.), LEVEZIEL (H.), TEALE (A. J.), QUÉVAL (R.).** El complejo mayor de histocompatibilidad de bovinos oeste-africanos. Tipaje de antígenos linfocitarios (BoLA) de taurinos Baule (*Bos taurus*) y de cebues Sudaneses (*Bos indicus*) del Burkina Faso (África occidental). *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1989, **42** (2) : 275-281.

El tipaje de los antígenos linfocitarios (BoLA) en 247 taurinos Baule (*Bos taurus*) y 106 cebues sudaneses (*Bos indicus*) permitió determinar las frecuencias genicas de 43 especificidades de clase I, tanto oficiales, mundiales « W » y europeas « EU », como locales africanas del Kenya « KN » y del Burkina Faso « BF ». La comparación de estas frecuencias evidencia ciertas especificidades que se pueden considerar como marcadores significativos de razas taurinas Baule o cebú. *Palabras claves* : Bovino Baule - Cebú - Antígeno linfocitario - Marcador genético - Burkina Faso.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Abstracts of the 20th International Conference on Animal Blood Groups and Biochemical Polymorphism, Helsinki (Finland), 28 July to 1st August 1986. *Anim. Genetics*, 1987, **18** (suppl. 1).
2. ADAMS (T. E.), BRANDON (M. R.). Genetic aspects of disease resistance in cattle. In : BUTLER (J. E.), ed. The ruminant system. New-York, London, Plenum Press, 1981. Pp. 451-473.
3. AMORENA (B.), STONE (W. H.). Bovine lymphocyte antigens (BoLA) : a serologic, genetic and histocompatibility analysis. *Tissue Antigens*, 1982, **16** (3) : 212-225.
4. CALDWELL (J.). Polymorphism of BoLA system. *Tissue Antigens*, 1979, **13** : 319-326.
5. FALCONER (D. S.). Introduction to quantitative genetics. New-York, London, Longman, 1981.
6. KEMP (S. J.), SPOONER (R. L.), TEALE (A. J.). A comparative study of major histocompatibility complex antigens in East African and European cattle breeds. *Anim. Genetics*, 1988, **19** : 17-29.

7. Joint Report of first international bovine lymphocyte antigens (BoLA) workshop : Analysis of alloantisera against bovine lymphocytes. *Anim. Blood Grps Bioch. Genet.*, 1979, **10** : 63-86.
8. LEVEZIEL (H.). Le Complexe Majeur d'Histocompatibilité chez l'homme et chez les animaux. *Annl. Genet. Sel. Anim.*, 1979, **11** (3) : 281-356.
9. LEVEZIEL (H.), RENARD (C.), TANGUY (D.). Report of 1982 BoLA European comparison test. France, Jouy-en-Josas, INRA, 1982. Pp. 41-69. (Les Colloques de l'INRA n° 14).
10. LIE (O.), SOLBU (H.), LARSEN (H. J.), SPOONER (R. L.). Evidence for MCH control of immune responsiveness in cattle. *Vet. Immun. Immunopath.*, 1985.
11. Proceedings of the second international bovine lymphocyte antigens (BoLA) workshop. *Anim. Blood Grps Bioch. Genet.*, 1982, **13** : 33-53.
12. QUDDUS (J.), PRAKASH (S.), BAHN (R.), BANERJEE (S.), DAVID (C.). Genetics of immune response and susceptibility to disease. In : Proceedings 3rd World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Nebraska, July 1986. Pp. 593-613.
13. SPOONER (R. L.). the bovine MCH. *BoLA Newsletter*, 1985, **1** : 3-9.
14. SPOONER (R. L.), LEVEZIEL (H.), GROSCLAUDE (F.), OLIVIER (R. A.), VAIMAN (M.). Evidence for a possible major histocompatibility complex (BoLA) in cattle. *J. Immunogen.*, 1978, **5** : 335-346.
15. SPOONER (R. L.), LEVEZIEL (H.), HOSTE (C.), QUÉVAL (R.). Studies on the histocompatibility complex of indigenous cattle in the Ivory Coast. *Vet. Immunopath.*, 1987, **15** : 377-384.
16. SPOONER (R. L.), TEALE (A. J.). Breeding for disease resistance : The Major Histocompatibility Complex and disease genetics. A.B.R.O. Pp. 11-15.
17. STEAR (M. J.) *et al.* Breed differences in the frequency of bovine lymphocyte antigens. *Expl. clin. Immunogenet.*, 1987, **4** : 27-36.
18. TEALE (A. J.), KEMP (S. J.). BoLA typing applications in the Gambia. In : Abstracts of African Trypanotolerant Livestock Network meeting. Nairobi, Kenya, 1987.