

INRA Prod. Anim.,
2000, 13 (4), 269-276

M. SANCRISTOBAL-GAUDY¹, G. RENAND²,
Y. AMIGUES³, M.-Y. BOSCHER³,
H. LEVÉZIEL⁴, B. BIBÉ⁵

¹ INRA Laboratoire de Génétique Cellulaire,
BP 27, 31326 Castanet Tolosan Cedex

² INRA Station de Génétique Quantitative
et Appliquée, 78352 Jouy-en-Josas Cedex

³ LABOGENA, 78352 Jouy-en-Josas Cedex

⁴ INRA Laboratoire de Génétique Biochi-
mique et de Cytogénétique, 78352 Jouy-
en-Josas Cedex

⁵ INRA Département de Génétique Animale,
BP 27, 31326 Castanet Tolosan Cedex

Courriel : msc@toulouse.inra.fr

Traçabilité individuelle des viandes bovines à l'aide de marqueurs génétiques

Des tests d'ADN, tels que ceux employés en médecine légale, peuvent être utilisés à des fins de traçabilité individuelle des animaux et des produits dérivés, la viande notamment. Cette approche, dans un contexte économique difficile lié à la crise de la « vache folle », va permettre de sécuriser et de renforcer la nouvelle réglementation sur l'étiquetage des viandes en suivant l'identification des bovins de l'étable à l'étal.

Depuis le début des années 80 on constate, en France comme dans le reste de l'Europe, une réduction significative de la consommation de viande bovine dont les causes sont multiples (Potherat et Mainsant 1995, Combris 1997). Les consommateurs exigent maintenant une meilleure information sur la qualité nutritionnelle et sanitaire des produits qui leur sont proposés. Cette exigence implique que l'origine de la viande soit garantie, c'est-à-dire qu'il y ait traçabilité continue depuis l'animal jusqu'aux pièces de viande commer-

cialisées. C'est ainsi qu'ont été mis en place des accords interprofessionnels et des réglementations administratives pour l'ensemble de la filière, d'abord à l'échelle nationale puis de la communauté européenne, de même que des cahiers des charges spécifiques à certaines filières d'approvisionnement du type Label Rouge ou enseignes de grande distribution, pour que l'information portée sur les étiquettes soit claire et compréhensible par les consommateurs et permette toute vérification de l'exactitude de cette information.

Résumé

En réponse à la crise de confiance des consommateurs et leur régulière désaffection pour la viande bovine, et dans le cadre des efforts développés actuellement pour améliorer et sécuriser la traçabilité des bovins, nous avons pour objectif de proposer et de valider une méthode d'identification individuelle des viandes bovines à l'aide de marqueurs moléculaires de type microsatellite. Plusieurs prélèvements ont été effectués sur des jeunes bovins de domaines expérimentaux INRA, *in vivo* et *post mortem*. La détermination des génotypes aux 11 loci, puis la comparaison deux à deux de ces génotypes à l'aide d'une méthode statistique adéquate prenant en compte les particularités des microsatellites permet de recommander d'une part que le typage soit réalisé sur au moins huit marqueurs pour assurer une traçabilité parfaite, et d'autre part que des précautions indispensables soient prises concernant la qualité des prélèvements et la gestion des échantillons lors d'une mise en œuvre à grande échelle.

Depuis de nombreuses années un système d'identification des bovins et des cheptels fonctionne en France dans un but de suivi zootechnique et sanitaire des animaux et des élevages. Suite au règlement CE n° 820/97, cette exigence fut étendue à tous les pays de la communauté et a conduit à la mise en place d'une nouvelle identification pérenne généralisée (IPG) de tous les bovins nés ou élevés en France avec constitution d'une base de données centralisées. Ces outils (double bouclage, registre bovin, passeport, etc.) permettent d'identifier et de suivre tout animal, ainsi que son statut sanitaire, présent en France de sa naissance (ou son entrée en France) à son abattage (ou sa sortie de France) quels que soient le ou les détenteurs successifs.

Si l'existence d'un système d'identification des bovins en France a permis une réaction rapide à la crise de l'ESB en 1996 en indiquant l'origine française des viandes (VBF), l'interprofession a décidé en février 1997 d'aller plus loin en signant un accord pour qu'au minimum figurent les trois informations suivantes sur l'étiquette des viandes bovines : origine (animal né, élevé et abattu en France), catégorie (Jeune Bovin, Taureau, Génisse ou Vache) et type racial (Laitier, à Viande ou Mixte).

Si cet étiquetage a pour objectif d'informer le consommateur sur l'origine de la viande qui lui est proposée, il est indispensable de mettre en place un système qui lui garantisse la fiabilité des informations indiquées. La traçabilité ainsi définie doit permettre aux services de contrôle de retrouver et d'apporter la preuve, *a posteriori*, de la véracité des informations en remontant jusqu'au numéro d'identification de l'animal et à l'élevage de provenance.

De la naissance de l'animal à la pièce de viande, le suivi de l'identification se trouve confronté à un certain nombre de contraintes. Tant que l'animal est encore vivant, l'IPG assure une traçabilité théoriquement sans faille du fait d'un numéro d'identification unique, de la pose de deux boucles, de l'édition d'un passeport et de l'obligation faite à chaque nouveau détenteur (éleveur, transporteur, abatteur) de vérifier la concordance entre les numéros d'identification portés sur les boucles et sur le passeport. A l'abattoir, il est par contre techniquement impossible de maintenir cette IPG sur les carcasses et les pièces de viande préparées en atelier de découpe. Les carcasses sont en effet repérées à partir d'un numéro de tuerie et d'une date d'abattage, alors qu'un numéro de lot est attribué aux pièces de viande. Les entreprises d'abattage et de découpe ont dû réorganiser en profondeur leurs méthodes de travail afin d'éviter le mélange des pièces de viande issues d'animaux différents (Dupit 1998) et d'assurer la correspondance entre les différents identifiants utilisés.

Tout au long de la filière peuvent donc surgir des difficultés liées à des opérations de saisie d'information ou de transfert et de vérification d'information, qui constituent donc des maillons faibles si on considère l'ensemble des précautions nécessaires à une parfaite traçabilité comme une chaîne à ne pas interrompre (Chaisemartin 1998).

La traçabilité ne peut être garantie que s'il existe un système de vérification et de contrôle tout au long de la chaîne. Différentes techniques existent permettant de vérifier *a posteriori* les informations portées sur les étiquettes. L'origine géographique, ainsi que le type d'alimentation, devraient pouvoir être déterminés à partir de méthodes analytiques. C'est ainsi que la détermination des teneurs en isotopes stables, méthode actuellement appliquée aux végétaux, devrait permettre

d'authentifier le lieu de production d'animaux réputés nourris avec des ressources locales, eau de boisson et végétaux (Renou 1998). L'analyse des composés volatils est également un puissant moyen de caractérisation car elle permet d'obtenir une «signature» des produits (Thonat *et al* 1999). En effet, après constitution d'une banque de signatures caractéristiques de différents types de production, il est possible de comparer la signature d'un produit donné avec cette banque et de reconnaître l'origine en appliquant une modélisation statistique dite des réseaux de neurones. Ces méthodes analytiques font l'objet de recherches poussées à la Station de Recherches sur la Viande de l'INRA de Theix afin de mettre au point des techniques de mesure rapides qui soient utilisables dans de nombreux secteurs de l'agro-alimentaire. Toutefois, cette approche tient plus d'une vérification statistique que d'une traçabilité individuelle.

S'il est facile de vérifier le sexe de l'animal à partir d'un échantillon de viande par la mise en évidence de marqueurs ADN du chromosome Y (Léonard *et al* 1987), il n'est pas envisageable de préciser le type d'animal. D'autre part, l'analyse des fréquences des différents allèles de marqueurs ADN du type microsatellite a permis de caractériser de nombreuses races bovines et de montrer qu'il est possible de les discriminer (Moazami-Goudarzi *et al* 1997). Connaissant les profils caractéristiques de ces races, il est possible d'assigner un individu à l'une d'entre elles en comparant son propre profil aux profils moyens de ces races. Cette approche repose également sur une vérification statistique par des calculs de probabilité d'appartenance, distances génétiques, réseaux de neurones, etc. (Cornuet *et al* 1996, Ollivier *et al* 2000). Ces marqueurs sont neutres vis-à-vis de l'évolution des races puisqu'ils ne correspondent pas à des gènes codants. Ils sont utilisés en attendant l'identification de gènes marqueurs responsables d'un phénotype caractéristique de la race. C'est ainsi que des recherches sont actuellement menées sur les gènes de la coloration de la robe des bovins dans un but de détermination raciale (Rouzaud *et al* 2000).

Toutes ces méthodes de vérification *a posteriori* de l'origine ou de la race de l'animal dont est issue la pièce de viande expertisée sont basées sur la comparaison d'un profil pour une série de caractéristiques plus ou moins discriminantes avec des profils de référence déterminés au préalable. De ce fait les réponses sont du type probabiliste et, si elles permettent de vérifier la vraisemblance de l'information générique portée sur les étiquettes, elles ne permettent pas de vérifier l'intégrité de l'identification tout au long de la filière. Il convenait donc de mettre en place une méthode qui pallie ces inconvénients.

Tant que le matériel moléculaire (ADN) n'est pas dégradé, la séquence génétique d'un individu, unique et inaltérable, peut être utilisée comme l'identifiant individuel qui assure

une traçabilité parfaite, indépendante des aléas de saisie ou de transfert d'information. Il est bien évidemment illusoire de vouloir connaître la séquence génétique complète de chaque animal, mais il est possible d'envisager l'identification des animaux à partir d'un nombre restreint de régions du génome dont le typage soit facile et automatisable. Ces régions (loci) doivent être polymorphes et en nombre suffisant pour assurer que chaque individu soit caractérisé d'une manière unique parmi l'ensemble de la population de l'espèce. Cette approche, connue sous le nom de test d'ADN, est de plus en plus utilisée en médecine légale (voir par exemple Balding et Nichols 1995).

Cet article présente les résultats d'une expérience réalisée dans le cadre d'un contrat entre Interbev et le CIV (Centre d'Information sur les Viandes) d'une part, l'INRA et LABOGENA d'autre part, pour mettre au point et valider une méthode d'identification individuelle des bovins (animaux et viande) à l'aide de marqueurs génétiques moléculaires.

1 / Matériel et méthodes

De l'ADN a été extrait de différents prélèvements sur animaux et sur viande pour typer les allèles d'un certain nombre de marqueurs. Un marqueur est un segment de la molécule d'ADN qui peut présenter diverses formes ou allèles (polymorphisme) dans la population. Le nombre et la fréquence des allèles est variable selon le marqueur considéré et la population concernée. Les marqueurs de type microsatellite présentent l'intérêt d'avoir souvent un fort polymorphisme. Pour chaque marqueur, un individu possède deux allèles, un transmis par son père et un transmis par sa mère, qui déterminent son génotype à ce marqueur. Sur un ensemble de marqueurs, la combinaison des paires d'allèles typés permet de déterminer un génotype propre à chaque individu pour ces marqueurs et donc de le caractériser.

En prenant en compte la fiabilité des techniques de génétique moléculaire, il convient de trouver le nombre de marqueurs à utiliser pour que les génotypes mis en évidence soient suffisamment représentatifs de l'ensemble du génome des animaux étudiés afin d'éviter toute erreur d'identification et d'assurer ainsi une traçabilité parfaite.

1.1 / Les prélèvements

Différents prélèvements ont été effectués sur 144 jeunes bovins des domaines INRA de Bourges et du Pin-au-Haras, en majorité de race charolaise, dont certains étaient demi-frères. Six types de prélèvements ont été réalisés dans cette étude : sur l'animal en vif (sang, poils) et après abattage avec deux degrés de maturation de la viande (24 heures, 15 jours) et deux méthodes de prélèvement (au scalpel et à l'aiguille à biopsie à titre de test). Le nombre total des prélèvements s'élève à 552.

1.2 / Les typages

Compte tenu de la diversité du matériel biologique utilisé, il a été nécessaire d'adapter les méthodes d'extraction de l'ADN à chaque type de prélèvement (tableau 1).

Tableau 1. Méthodes d'extraction de l'ADN adaptées à chaque type de prélèvement.

Sang

Lavage (2 heures à 4°C) de 1 ml de sang avec 4 ml d'une solution de NE (NaCl 10 mM, EDTA 10 mM) et récupération du culot des leucocytes par centrifugation. L'opération est renouvelée deux fois. Lyse alcaline des leucocytes par une solution de NaOH 200 mM (2 heures à 65°C). Neutralisation par une solution de HCl 200 mM, Tris-HCl 100 mM:

Poils

A partir des bulbes de trois poils ajouter directement le NaOH (1 heure à 65°C). Neutraliser avec la solution HCl, Tris-HCl.

Viande

A partir de 5 à 10 mg de viande ajouter directement le NaOH (2 heures à 65°C). Neutraliser avec la solution HCl, Tris-HCl.

Onze marqueurs de type microsatellite ont été sélectionnés parmi ceux qui ont déjà été utilisés dans divers programmes de recherche de QTL, de diversité génétique ou de contrôle de paternité. Génétiquement indépendants, polymorphes, aptes à être multiplexés (analysés conjointement) et analysés sur un séquenceur automatique, leur qualité de typage devait être assurée. Ces onze marqueurs microsatellites ont été amplifiés lors d'une seule réaction de PCR en utilisant des amorces marquées avec trois fluorochromes différents permettant de détecter simultanément tous les produits d'amplification (voir encadré). Les produits de PCR sont analysés par un séquenceur automatique ABI 310 et les profils obtenus pour les différents marqueurs sont interprétés à l'aide des logiciels GENESCAN et GENOTYPER pour déterminer les génotypes qui sont transférés dans une base de données permettant la comparaison entre les échantillons.

Les typages des 552 échantillons provenant des 144 bovins ont été réalisés en aveugle à LABOGENA, de manière à prendre en compte les éventuelles erreurs de typage inhérentes à ce type de marqueur.

1.3 / L'approche statistique

Une approche classique dite du maximum de vraisemblance a été adoptée dans cette étude. L'analyse statistique des résultats a été réalisée sur les génotypes obtenus lors d'un seul typage pour prendre en compte d'éventuelles erreurs de typage.

Empreintes génétiques obtenues à l'aide des profils électrophorétiques de marqueurs microsatellites.

Trois échantillons (sang, poil et viande) appartenant à un même animal ont été analysés à l'aide de 11 marqueurs microsatellites. Chaque marqueur se situe dans une gamme de taille bien précise et est marqué à l'aide d'une molécule fluorescente bleue (6-FAM), verte (TET) ou jaune (HEX).

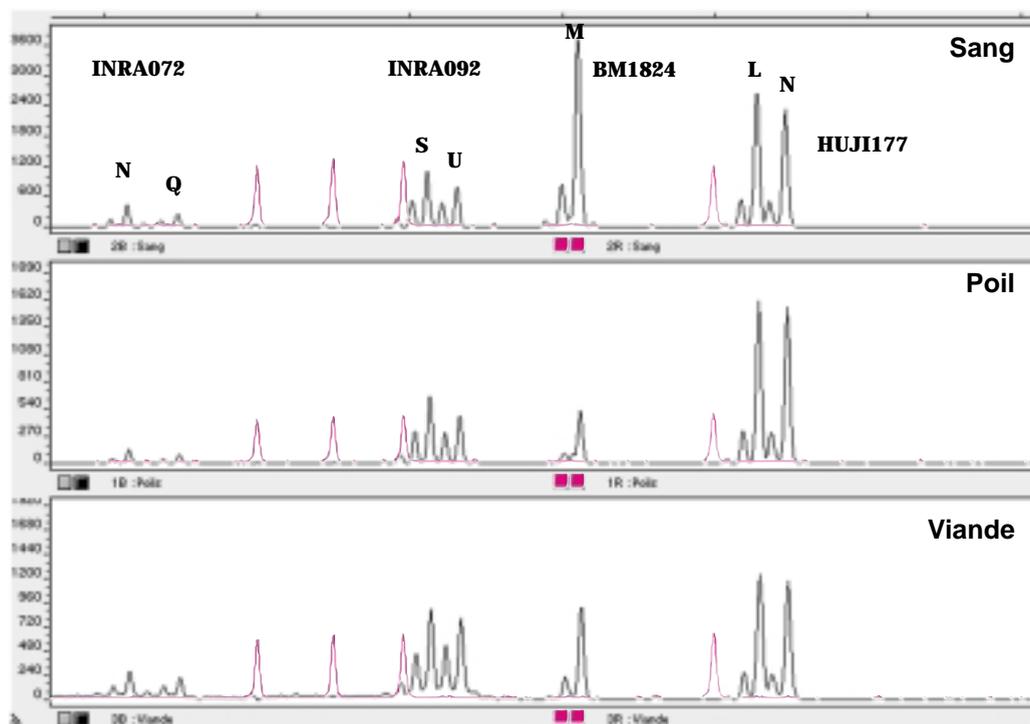
Marqueur

Fluorochrome

TGLA 227	TET
INRA 222	HEX
INRA 072	6-FAM
ILSTS 065	TET
INRA 092	6-FAM
ETH 225	HEX
INRA 135	TET
INRA 177	HEX
BM 1824	6-FAM
HUJI 177	6-FAM
SPS 115	HEX

La courbe rouge correspond à un standard de

Profils obtenus dans trois prélèvements avec les 4 microsatellites marqués avec le fluorochrome 6-FAM :



La comparaison des génotypes déterminés sur deux échantillons permet de s'assurer qu'ils proviennent d'un même animal.

taille qui permet de déterminer la taille exacte de chacun des allèles des différents marqueurs. Les tailles des allèles ainsi obtenus sont transcrites en terme d'allèle lettre (exemple sur le profil 'Sang') et sont, après importation dans une base de données informatique, facilement exploitables pour les traitements automatiques de comparaison d'échantillons.

Marqueur

Allèle au marqueur

	Sang	Poil	Viande
TGLA 227	KO	KO	KO
INRA 222	HL	HL	HL
INRA 072	NQ	NQ	NQ
ILSTS 065	LP	LP	LP
INRA 092	SU	SU	SU
ETH 225	OO	OO	OO
INRA 135	JM	JM	JM
INRA 177	PP	PP	PP
BM 1824	MM	MM	MM
HUJI 177	LN	LN	LN
SPS 115	LL	LL	LL

Etant donné les génotypes à 11 loci de 2 échantillons, nous voulons tester l'hypothèse H_0 : « les 2 échantillons proviennent du même individu » contre l'hypothèse H_1 : « les 2 échantillons proviennent de 2 individus quel-

conques ». En notant L_0 (respectivement L_1) la vraisemblance des données sous l'hypothèse H_0 (respectivement H_1), la valeur du rapport L_1/L_0 va permettre de déclarer vraie soit H_0 , soit H_1 .

La qualité du test sera mesurée selon deux critères : la probabilité de décider que deux échantillons du même animal proviennent de deux individus différents d'une part (c'est-à-dire accepter l'hypothèse H1 alors que c'est H0 qui est vraie), et la probabilité de décider que deux échantillons provenant de deux individus différents sont issus du même individu (c'est-à-dire accepter H0 alors que H1 est vraie) d'autre part ; ces deux quantités doivent être quasiment nulles. Ces tests statistiques ont porté sur 548 prélèvements issus des 140 animaux ayant au moins deux prélèvements.

2 / Résultats

2.1 / Qualité de l'ADN

De l'ADN de bonne qualité a été extrait de toutes les catégories d'échantillons du protocole, notamment de la viande après 15 jours de maturation, prélevée ou non à l'aiguille à biopsie, et du sang. Seuls les échantillons de poils ont nécessité plus de travail. Le nombre d'extractions ayant dû être refaites pour obtenir de l'ADN analysable est présenté dans le tableau 2 selon le type de prélèvement.

Tableau 2. Bilan des extractions d'ADN selon le type de prélèvement.

Type de prélèvement	Nombre total	Extractions refaites
Sang	110	7 (6,4 %)
Poils	140	31 (22,1 %)
Viande	302	2 (0,7 %)

Sur les onze marqueurs utilisés, un seul a présenté des problèmes lors de son amplification par PCR. Pour les dix autres marqueurs les défauts d'amplification sont faibles (1,1 % en moyenne) et dépendent en fait du type de prélèvement (tableau 3), avec une fréquence plus élevée pour les prélèvements de viande à l'aiguille à biopsie et pour les poils. Les échantillons sanguins et de viande prélevée au scalpel présentent très peu de problème technique d'amplification.

Tableau 3. Défauts d'amplification selon le type de prélèvement (tous les marqueurs, sauf le 11).

Type de prélèvement	Nombre d'échantillons	Défauts d'amplification ⁽¹⁾
Sang	110	2 (0,2 %)
Poils	140	25 (1,8 %)
Viande 24h scalpel	126	1 (0,1 %)
Viande 24h aiguille	48	17 (3,5 %)
Viande 15j scalpel	84	2 (0,2 %)
Viande 15j aiguille	44	15 (3,4 %)

⁽¹⁾ Pourcentage calculé en rapportant le nombre de défauts au nombre total d'amplifications (= nombre d'échantillons x 10 marqueurs).

La qualité de l'ADN extrait des différents échantillons est donc très satisfaisante. Les meilleurs résultats sont toutefois obtenus pour les échantillons de sang et de viande prélevée au scalpel qui nécessitent en définitive moins de travail pour obtenir de l'ADN amplifié de bonne qualité.

2.2 / Fiabilité des typages

Les différents échantillons d'un même animal ont été comparés deux à deux à l'aide du test statistique, sur l'ensemble des animaux ayant au moins deux prélèvements (548 prélèvements utilisables issus de 140 individus). Des erreurs de typage ont ainsi pu être détectées, elles sont présentées dans le tableau 4 pour chacun des marqueurs. Le taux global de génotypes faussement déterminés est égal à 0,8 %. Le taux global d'allèles faussement déterminés est égal à 0,4 %. L'ensemble des résultats de typage est donc très satisfaisant. Il est à noter qu'en fait la majorité (73 %) des erreurs de typage est liée à la présence d'allèles quasi-nuls (un allèle n'est pas détecté car masqué par l'autre lors de la lecture du gel), ce qui est parfois observé pour ce type de marqueur microsatellite.

Dans la pratique, l'observation d'une incohérence conduira à refaire le typage afin de vérifier la réalité de celle-ci. A titre indicatif, au cours de cette expérimentation la simple relecture de 42 gels pour lesquels une erreur de génotype avait été détectée a permis d'en corriger 24, soit 57 %.

En définitive, les techniques de génétique moléculaire mises en œuvre offrent une bonne sécurité, avec un taux d'erreur de génotypage inférieur à 0,4 % lorsqu'une vérification des incohérences est réalisée.

Tableau 4. Défauts d'amplification et erreurs de typage recensés par marqueur.

Locus	Nom	Absence d'amplification	Nombre de génotypes faux ⁽¹⁾	dont allèles quasi-nuls
1	TGLA227	1/552 (0,2 %)	3/547 (0,5 %)	1 (33 %)
2	INRA222	1/552 (0,2 %)	4/547 (0,7 %)	3 (75 %)
3	INRA072	28/552 (5,1 %)	16/520 (3,1 %)	10 (63 %)
4	ILSTS065	1/552 (0,2 %)	3/547 (0,5 %)	3 (100 %)
5	INRA092	3/552 (0,5 %)	4/545 (0,7 %)	4 (100 %)
6	ETH225	0/552 (0 %)	1/548 (0,2 %)	1 (100 %)
7	INRA135	4/552 (0,7 %)	2/544 (0,4 %)	0 (0 %)
8	INRA177	5/552 (0,9 %)	0/543 (0 %)	
9	BM1824	18/552 (3,3 %)	6/53 (1,1 %)	6 (100 %)
10	HUJI177	1/552 (0,2 %)	1/547 (0,2 %)	0 (0 %)
11	SPS115	272/552 (49,8 %)	5/276 (1,8 %)	5 (100 %)
Total		62/5520⁽²⁾ (1,1 %)	45/5694 (0,8 %)	33 (73 %)

⁽¹⁾ Parmi les échantillons amplifiés des 448 prélèvements utilisables.

⁽²⁾ Hormis le locus 11.

2.3 / Qualité du dispositif de traçabilité

La qualité du dispositif dépend en premier lieu du polymorphisme qui existe au sein de la population pour chacun des marqueurs retenus : plus celui-ci est élevé, plus est faible la probabilité de trouver deux individus ayant tous leurs allèles identiques. Un fort polymorphisme est effectivement observé pour chacun des loci étudiés, avec 5 à 12 allèles mis en évidence (tableau 5). Compte tenu des fréquences observées pour les différents allèles, il est possible de calculer la proportion d'individus dont les deux allèles sont différents à un locus donné, c'est-à-dire le degré d'hétérozygotie. Pour neuf des onze marqueurs celui-ci est supérieur à 0,70, allant jusqu'à 0,87. Sur l'ensemble des marqueurs, le taux global d'hétérozygotie est de 0,97.

Tableau 5. Nombres d'allèles identifiés et degrés d'hétérozygotie observés dans l'échantillon.

Marqueur	Nombre d'allèles	Hétérozygotie
TGLA 227	12	0,869
INRA 222	11	0,844
INRA 072	8	0,764
ILSTS 065	8	0,757
INRA 092	9	0,774
ETH 225	5	0,703
INRA 135	8	0,774
INRA 177	11	0,549
BM 1824	5	0,746
HUJI 177	7	0,764
SPS 115	5	0,590
Total		0,967

Afin de tester l'aptitude du panel de marqueurs retenus à assurer la traçabilité des individus d'un prélèvement à l'autre, les proportions de fausses décisions ont été évaluées dans les trois situations suivantes : (a) calcul direct sur les 548 échantillons de l'expérimentation, (b) calculs théoriques sur des animaux issus d'une population dont les fréquences alléliques seraient identiques à celles observées lors de cette expérimentation, (c) calculs sur des génotypes simulés par des tirages aléatoires des allèles.

a) La traçabilité évaluée sur les 548 prélèvements a été parfaite : tous les prélèvements effectués sur un animal (poils, sang, viande) ont pu être attribués à cet animal et à lui seul. Les rares erreurs de génotypage signalées précédemment n'ont pas perturbé ces attributions.

b) A l'aide des fréquences alléliques calculées avec l'échantillon des bovins charolais du domaine de Bourges, supposé représentatif de la population charolaise, la probabilité que deux individus quelconques de cette population aient le même génotype aux 11 loci est égale à $5,10^{-12}$ (tableau 6). La probabilité que 2 demi-frères (respectivement plein frères) de cette population aient le même génotype aux 11 loci est de $5,7,10^{-9}$ (respecti-

vement $4,6,10^{-5}$). Ces quantités extrêmement faibles dénotent une grande puissance du dispositif étudié.

Tableau 6. Probabilités que deux individus aient le même génotype.

Individus	11 locus	8 locus	5 locus
non apparentés	$5,0,10^{-12}$	$7,5,10^{-10}$	$7,2,10^{-5}$
demi-frères	$5,7,10^{-9}$	$1,9,10^{-7}$	$9,8,10^{-4}$
plein frères	$4,6,10^{-5}$	$3,9,10^{-4}$	$1,9,10^{-2}$

Si le nombre de loci est plus faible, la probabilité d'avoir deux génotypes identiques pour deux individus différents augmente. A l'évidence, 5 loci sont insuffisants pour identifier convenablement un bovin charolais car il existe un risque d'environ 1/14 000 que deux veaux charolais aient des allèles identiques à ces cinq loci.

c) Dix mille couples de génotypes à 11 loci ont été simulés, sous chacune des deux hypothèses qui ont fait l'objet de cette étude : H0=même individu ou H1=deux individus différents. Quelques erreurs de génotype ont été introduites aléatoirement dans une proportion de 1 % d'allèles faussement déterminés, ce qui est bien supérieur à ce qui a été observé dans le cadre de notre expérience.

Le test de maximum de vraisemblance montre que tous les individus différents ont été déclarés comme tels par le test statistique, c'est-à-dire qu'il n'y a pas un seul cas parmi les 10 000 où l'hypothèse H0 soit acceptée alors que l'hypothèse H1 était vraie.

Lorsque la simulation a été réalisée sous l'hypothèse H0, il n'y a eu que 3 cas sur les 10 000, soit 0,03 %, où les deux échantillons ont été déclarés provenir de deux individus différents alors qu'ils provenaient d'un seul et même individu. Cette occurrence, bien que calculée avec un taux d'erreur de génotypage de 1 %, est très faible. Comme dans la pratique les génotypes litigieux seront systématiquement déterminés à nouveau, il peut être retenu que l'immense majorité des ambiguïtés seront levées. Cette fréquence de 0,03 % est donc à considérer comme la fréquence maximale de l'erreur qui est faite lorsqu'on déclare que deux échantillons proviennent de deux individus différents alors qu'il ont été prélevés sur le même animal.

En conclusion de cette partie, des suggestions peuvent être faites concernant le nombre minimum de marqueurs nécessaire pour assurer une traçabilité quasi parfaite. Avec les fréquences d'allèles obtenues dans la présente expérimentation, il apparaît que huit loci (convenablement choisis sur la base d'un fort polymorphisme) sont nécessaires et qu'en deçà, le nombre d'erreurs de décision deviendrait inacceptable. Ce nombre de loci est plus élevé que celui avancé par Meghen *et al* (1998). Le choix des marqueurs doit reposer sur le degré d'hétérozygotie moyenne

Pour être discriminant, le génotype de chaque échantillon doit être déterminé sur un nombre suffisant de marqueurs. Ceux-ci doivent être choisis en fonction du nombre d'allèles possibles, des fréquences alléliques dans la population et de l'indépendance de leur répartition.

comme mesure du polymorphisme plutôt que sur le nombre d'allèles, car l'existence d'allèles nombreux mais rares n'apporte guère un surcroît de puissance.

Conclusion

Tous les types de prélèvements étudiés (poils, sang, viande au scalpel ou à l'aiguille à biopsie, 24 heures ou 15 jours après abattage) ont donné de bons résultats en terme de qualité de l'ADN extrait, à quelques nuances près. En particulier, le scalpel pourra être remplacé par l'aiguille à biopsie sans grand risque de perte d'information. Suite à cette étude, des analyses préliminaires ont été pratiquées sur la viande après cuisson (micro-ondes, poêle). L'obtention, même dans ces conditions, d'ADN de bonne qualité renforce encore l'intérêt de notre approche.

Les rares erreurs de génotypage liées aux marqueurs microsatellites sont une réalité et il serait malhonnête de passer cet aspect sous silence. Pour la première fois sont publiés ici les divers aspects de la qualité des typages effectués à LABOGENA, en terme de qualité de l'ADN et de l'amplification PCR, selon le type d'échantillon. Les rares erreurs comptabilisées n'ont pas mis en cause la démarche générale puisque le modèle statistique les prend en considération, et que, de toute façon, elles sont levées à la moindre incohérence observée par un nouveau typage.

Des erreurs d'étiquetage d'échantillons lors de l'expérimentation ont été mises en évidence. Ceci souligne encore les bonnes performances de ce dispositif de traçabilité (méthodologies moléculaire et statistique), mais permet aussi d'attirer l'attention sur la gestion des échantillons qui devra être extrêmement rigoureuse et sans faille, si ce type de suivi des viandes bovines est mis en place à grande échelle. De plus cela apporte une preuve supplémentaire de l'intérêt de réaliser de tels types de contrôle au cours de la chaîne pour en vérifier la fiabilité.

Il faut souligner que les divers prélèvements furent effectués dans des domaines ou abattoir expérimentaux de l'INRA et que, pour une utilisation en élevage, en abattoir ou en atelier de découpe, il est primordial d'accorder la plus grande importance à la qualité des prélèvements afin d'éviter toute contamination par du matériel génétique provenant d'autres animaux, ce qui pourrait fausser les résultats.

Pour conclure, la faisabilité d'une méthode de traçabilité individuelle des viandes grâce à des marqueurs moléculaires de type microsatellite a été prouvée en toute rigueur dans cette étude. En particulier cette méthode est particulièrement apte à détecter toute incompatibilité d'identification entre une pièce de viande et l'animal dont elle est supposée provenir. La puissance du dispositif a été évaluée selon le nombre de marqueurs utilisés en montrant l'intérêt de marqueurs polymorphes avec un degré élevé d'hétérozygotie.

La mise en place d'une traçabilité quasi parfaite des animaux et des viandes dans la filière viande bovine ne dépend donc plus de la maîtrise des techniques de génétique moléculaire, mais de l'organisation de cette filière pour prélever les animaux, extraire l'ADN, le stocker et le géotyper. Il est possible d'imaginer différents scénarios plus ou moins contraignants. Une solution maximaliste serait de constituer une banque d'ADN systématique pour tout bovin né ou élevé en France parallèlement à celle générée par l'IPG. Pour ceci il serait nécessaire de prévoir le prélèvement systématique d'un tissu (poil, morceau d'oreille) lors de l'identification de l'animal (pose des boucles). Une solution moins systématique pourrait consister à ne réaliser ces extractions d'ADN et ces géotypages que lorsqu'il y a nécessité de vérifier l'information portée sur une étiquette. Pour ceci il est nécessaire de disposer d'un prélèvement de tissu dont l'origine ne puisse être mise en doute. Le prélèvement puis le stockage par l'abattoir de l'ensemble oreille / boucle d'identification de tout animal abattu pourrait servir de preuve irréfutable de la liaison animal / viande lorsque le géotypage sera effectué.

L'essentiel des problèmes à résoudre pour mettre en place une traçabilité individuelle des viande à l'aide de marqueurs moléculaires concerne des aspects de logistique, d'organisation et de volonté des opérateurs de la filière.

Remerciements

Nous remercions toutes les personnes qui ont contribué à l'obtention des échantillons et à l'acquisition des résultats présentés, en particulier les collègues des domaines INRA de Bourges et du Pin-au-Haras, ainsi que la société INTERBEV et le CIV pour leur soutien financier (contrat B01536).

Références

- Balding D.J., Nichols R.A., 1995. A method for quantifying differentiation between populations at multi-allelic loci and its implications for investigating identity and paternity. *Genetica*, 96, 3-12.
- Chaisemartin D., 1998. Bovins, ovins, caprins, porcins. La traçabilité est aussi une contrainte réglementaire. *Viandes Prod. Carnés*, 19, 9-14.
- Combris P., 1997. La consommation des produits animaux en France : tendances et perspectives d'évolution. *INRA Prod. Anim.*, 10, 267-274.
- Cornuet J.M., Aulagnier S., Lek S., Franck P., Solignac M., 1996. Classifying individuals among infra-specific taxa using microsatellite data and neural networks. *C.R. Acad. Paris, Sciences de la vie/Life sciences*, 319,1167-1177.
- Dupit J., 1998. Abattage et découpe des viandes bovines. Les nouvelles contraintes exigent des réorganisations du travail. *Viandes Prod. Carnés*, 19, 25-30.
- Léonard M., Kirszenbaum M., Cotinot C., Chesné P., Heyman Y., Stinnakre M.G., Bishop C., Delouis C., Vaiman

- M., Fellous M., 1987. Sexing bovine embryos using Y chromosome specific DNA probe. *Theriogenology*, 27, 248.
- Meghen C.N., Scott C.S., Bradley D.G., MacHugh D.E., Loftus R.T., Cunningham E.P., 1998. DNA based traceability techniques for the meat industry. *Anim. Genet.*, 29 (Suppl. 1), 48-49.
- Moazami-Goudarzi K., Laloë D., Furet J.P., Grosclaude F., 1997. Analysis of genetic relationships between 10 cattle breeds with 17 microsatellites. *Anim. Genetics*, 28, 338-345.
- Ollivier L., Chevalet C., Foulley J.L., 2000. Utilisation des marqueurs pour la caractérisation des ressources génétiques. *INRA Prod. Anim.*, numéro hors série «Génétique moléculaire : principes et application aux populations animales», 247-252.
- Potherat C., Mainsant P., 1995. Le recul des viandes de ruminants dans la consommation de viandes, volailles et poisson en France au cours des 25 dernières années : une réorientation du choix des ménages. *Renc. Rech. Ruminants*, 2, 1-8.
- Renou J.P., 1998. Les méthodes analytiques. La dilution isotopique caractérise l'origine d'un produit. *Viandes Prod. Carnés*, 19, 77.
- Rouzaud F., Martin J., Gallet F., Delourme D., Petit J.M., Levézuel H., Julien R., Oulmouden A., 2000. Utilisation de marqueurs génétiques pour la traçabilité. Intérêt des gènes de la coloration de la robe chez le bovin. *INRA Prod. Anim.*, numéro hors série «Génétique moléculaire : principes et application aux populations animales», 243-245.
- Thonat C., Viallon C., Berdagué J.L., 1999. Caractérisation et différenciation de produits par analyse des composés volatils. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, 92, n°948, 365-371.

Abstract

Individual traceability of bovine meat using molecular markers.

In response to the confidence crisis of consumers and their regular disinterest on bovine meat, within the framework of efforts that are now developed to improve and secure bovine traceability, our aim was the proposal and validation of a method of individual identification of bovine meat via microsatellite molecular markers. Several samples were taken in vivo and post mortem from young cattle of INRA experimental farms. The 11 loci genotype determination, then the two-by-two comparison of these genotypes using an adequate

statistical method, taking into account the microsatellite particularities, allowed us to propose some advises on the typing effort (marker number) necessary for assuring a perfect traceability on one hand, and on essential precautions to be taken in large scale implementation, i.e. sample management, on the other hand.

SANCRISTOBAL-GAUDY M., RENAND G., AMIGUES Y., BOSCHER M.-Y., LEVEZIEL H., BIBE B., 2000. Traçabilité individuelle des viandes bovines à l'aide de marqueurs génétiques. *INRA Prod. Anim.*, 13, 269-276.