

Le Kouri : race bovine du lac Tchad

II. Etude biochimique : les hémoglobines et les constituants du sérum

par J.-P. PETIT (*) et R. QUEVAL (**)

RESUME

Appartenant à un ensemble d'articles destinés à approfondir les connaissances que nous avons de la race Kouri, ce 2^e de la série aborde l'aspect biochimique et génétique des constantes sanguines de cette race.

Les fréquences génétiques des hémoglobines ont été déterminées et 10 composantes sériques dosées. Ces analyses ont porté sur 344 échantillons provenant d'animaux choisis comme les plus représentatifs. Ceci permet d'indiquer des normes biochimiques pour le sang de la population bovine Kouri. On remarque l'absence d'hémoglobine C chez ces 344 animaux. L'un d'eux présente une hémoglobine non identifiée mais distincte de A, B ou C. Les protéines sériques sont en quantité égale au taux limite inférieur rencontré chez les bovins européens.

On doit enfin souligner que les Kouri appartiennent bien au type *Bos taurus typicus* (taurins) ainsi que le démontre l'examen des caryotypes de Kouri mâle.

I. INTRODUCTION

La connaissance zootechnique d'une race ne peut plus se concevoir maintenant sans englober des données biochimiques précises. Celles-ci concernent plus particulièrement les molécules qui ont une signification génétique, parmi lesquelles l'hémoglobine semble une des plus intéressantes chez les bovins.

C'est pourquoi, après avoir défini dans un premier article ce qu'est la race Kouri, son berceau et son environnement humain (10), ce sont les hémoglobines et les caractéristiques du sérum qui sont étudiées en tout premier lieu. Une étude particulière sera consacrée aux groupes sanguins (11).

II. MATERIEL ET METHODES

Les analyses exécutées ici, l'ont été en France (*) à partir d'échantillons sanguins prélevés en République du Tchad (**).

Le mode de prélèvement et de transport revêt donc une importance particulière dans l'interprétation des résultats. C'est en appliquant les méthodes mises au point par l'un de nous (6) que les échantillons convenables ont été récoltés et transportés, et que l'hémoglobine purifiée a été préparée. Tous les protocoles utilisés pour le travail et rappelés ici, sont décrits en détail dans le recueil des techniques du laboratoire de Biochimie de l'I.E.M.V.T.

a) Pour les hémoglobines

Les échantillons de sang complet récoltés permettent de préparer le plasma et l'hémoglobine purifiés. On détermine alors par électrophorèse en gel de polyacrylamide la nature

(*) I.E.M.V.T., Service de Biochimie et Service Informatique, 10, rue Pierre Curie, 94700 Maisons-Alfort.

(**) I.E.M.V.T., Laboratoire de Recherches Vétérinaires de Farcha, B.P. 433, Fort-Lamy (Tchad).

des Hb. La méthode utilisée permet la détection des Hb A, B, C et F, contrairement à la migration sur acétate de cellulose utilisée auparavant (7) et qui ne permettait pas cette distinction mais seulement celle des Hb A et B.

Les migrations s'effectuent en tube dans un gel à 5,5 p. 100 de cyanogum 45, en tampon Tris (0,0832 M), EDTA (0,0285 M), acide borique (0,00809 M) de pH 9,1 et de molarité 0,0941 (pour le gel et pour la migration). Chaque migration comporte 8 gels 65×6 mm de diamètre et dure 45 mn à 80 V (14 mA) et 17 mn à 160 V (32 mA). Elle est effectuée au réfrigérateur à $+5^\circ$ C.

b) Pour les constituants du sérum

On utilisait le plus souvent des sérums préparés sur place dans le pays d'où provenaient les échantillons; mais il a parfois été nécessaire de travailler sur plasma. Quand ils étaient hémolysés, l'hémoglobine y était dosée afin d'effectuer sur les résultats les corrections nécessaires pour éliminer l'influence de cette protéine sanguine. Quand c'était impossible, l'échantillon était éliminé.

Les protéines sériques ont été déterminées par micro-électrophorèse sur acétate de cellulose gélatineux (Phoroslid) en tampon Veronal (0,015 M), Veronal sodique (0,0703 M) de pH 8,6 et de molarité 0,0853; la migration durait 20 mn à 1,33 V/cm dans les cuves Millipore, à raison d'une cuve par Phoroslid.

Les lectures densitométriques et l'intégration étaient effectuées sur un densitomètre enregistreur (*) après diaphanisation.

La manipulation parallèle de sérums témoins étalonnés a permis de fixer la régularité des manipulations et leur minutie. On sait en effet la difficulté qu'il y a pour obtenir des résultats reproductibles et constants dans le temps par électrophorèse de zone (tableau V).

Les dosages de protéines totales ont été réalisés par spectrophotométrie à 547 nm après addition du réactif de Ardry (1). Les déterminations de l'azote total ont été faites par minéralisation sulfoxydrique en microkjeldhals, puis distillation de l'ammoniaque par entraînement à la vapeur d'eau dans un appareil en pyrex ne comportant qu'un seul rodage, le

dosage final de l'ammoniaque étant réalisé par une burette automatique couplée à un pHmètre de précision (Methrohm dosimat et potentiomètre E 353) réglé au pH final de 7. Un contrôle visuel était réalisé au moyen du mélange de Tashiro (rouge de méthyle).

La pression osmotique était déterminée (8) sur un osmomètre semi-automatique (*) utilisant 0,2 ml d'échantillon et assurant une précision de 0,1 mosm et une très bonne reproductibilité des mesures.

Les ions Ca^{++} et Mg^{++} ont été dosés par spectroscopie d'absorption atomique (Techtron), les solutions étalons ayant été soigneusement ajustées, particulièrement en ce qui concerne les concentrations en Na^+ et K^+ . Les ions K^+ et Na^+ ont été déterminés par photométrie de flamme (Eppendorf).

Le cholestérol total a été dosé par extraction dans un mélange acétone, alcool à 90° et trichloréthylène (50 p. 100 : 19,2 p. 100 : 30,8 p. 100 V/V) puis coloration de l'extrait chloroformique par l'anhydride acétique et l'acide sulfurique et enfin la lecture à 640 nm au spectrophotomètre.

L'analyse des résultats a été effectuée sur un ordinateur GE 55 pour lequel des programmes spéciaux ont été écrits, tels que par exemple la détermination des fréquences géniques pour les hémoglobines. Tous les résultats obtenus avec 7 décimales ont été arrondis pour les chiffres significatifs selon la règle classique (de 05 à 09 \rightarrow 10), ce qui amène parfois à des pourcentages dont la somme dépasse 100.

III. RESULTATS

1. Hémoglobines

Les fréquences géniques établies sur 364 animaux, permettent d'assigner des normes assez précises pour caractériser la race (tableau I). Ces résultats, comparés à ceux obtenus chez d'autres races, font ressortir l'absence d'Hb C chez les Kouri (tableau II). Les Kouri ne diffèrent ainsi des Tuli que par les 2,1 p. 100 de l'hémoglobine C qu'on rencontre dans cette race, ils sont proches des zébus M'Bororo de R.C.A.

(*) Apelab, 29, rue des Ecoles, 92 Bagneux.

(*) Osmette 2007, Precision Systems.

TABLEAU N° I
Détermination des hémoglobines chez les taurins Kourî
et leur fréquence génique

Phénotype	Fréquences observées	Fréquences observées	Intervalle de confiance à 5 p.100 des fréquences observées
A	134	0,368	0,319 - 0,418
AB	183	0,503	0,451 - 0,554
B	47	0,129	0,095 - 0,164
Totaux	364	1,000	
Nature du gène	Fréquences géniques	Fréquences géniques en p.100	Intervalle de confiance à 5 p.100
A	0,620	62,0 p.100	0,57 - 0,67
B	0,381	38,1 "	0,33 - 0,43
Totaux	1,001	100,1 "	

TABLEAU N° II
Comparaison des fréquences géniques des hémoglobines
chez quelques races bovines africaines

R a c e	Hb ^A	Hb ^B	Hb ^C	Hb ^D	Total N	A u t e u r s
Zébu Gobra	0,674	0,326			129	Petit 1968 et 1971
Zébu white Fulani	0,786	0,214			49	Bangham et Blumberg, 1958
Zébu Arabe	0,578	0,422			173	Quéval et Petit, 1971
Zébu Soudan	0,529	0,471			52	Bangham et Blumberg, 1958
Zébu Soudan	0,642	0,358			67	Petit, 1968
Zébu Foulbé	0,586	0,414			203	Petit, 1968
Zébu Malgache	0,378	0,622			226	Petit, 1968
Zébu Malgache	0,354	0,623	0,023		199	Osterhoff et Petit, 1972
N'Dama	1,000	0,000			50	Bangham et Blumberg, 1958
N'Dama	1,000	0,000			69	Petit, 1968
Baoulé	0,958	0,042			258	Petit, 1968
Tonga	0,417	0,417	0,166			Carr, 1964
Angoni	0,436	0,387	0,177			Carr, 1964
Tuli	0,580	0,399	0,021			Osterhoff, 1972
Mashona	0,866	0,117	0,017			Osterhoff, 1972
NGumi	0,883	0,064	0,053			Osterhoff, 1972

Des Hb étalons AC et BC étaient comparés dans les cas douteux, ce qui s'est présenté pour un animal possédant trois hémoglobines dont une aurait pu en imposer pour une Hb C. Mais la comparaison avec des phénotypes AC et BC, analysés dans les mêmes conditions au cours de la même migration électrophorétique (fig. 1), montre que ce n'est pas une Hb C. Bien que l'animal soit déjà âgé de plus de 6 mois, il semble s'agir d'un cas de persistance d'hémoglobine F. Des précisions sont actuellement recherchées.

2. Etude des protéines sériques par électrophorèse

Des analyses ont été faites sur 177 plasmas et sur 167 sérums. La comparaison des résultats obtenus sur ces deux types d'échantillons permet de conclure qu'ils ne diffèrent significativement que pour les β et γ globulines (tableau III). Pour ces dernières protéines, les résultats retenus comme caractéristiques sont ceux des 167 sérums, pour les autres il s'agit de la moyenne calculée sur 344 échantillons (tableau IV).

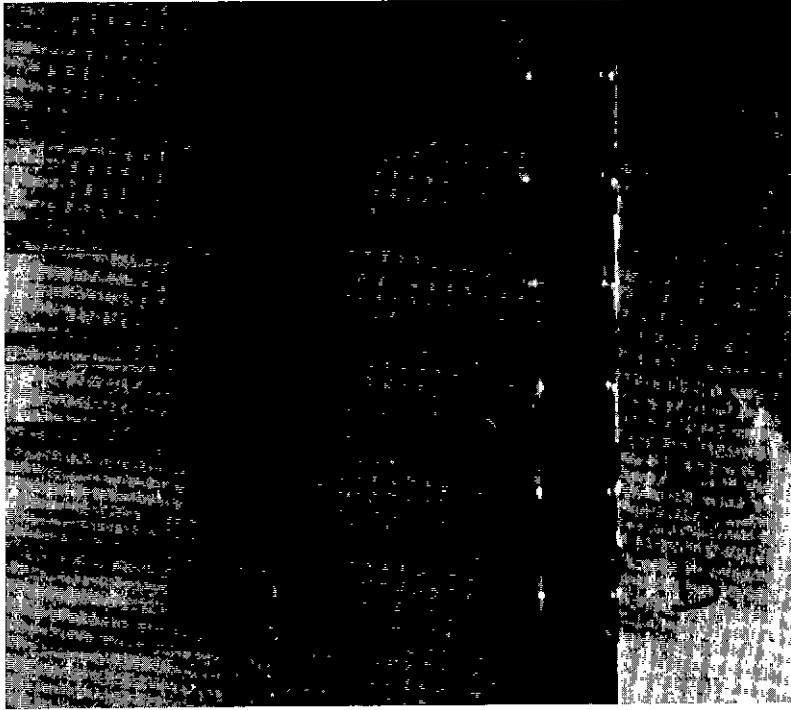


Fig. 1. — Migration test en gel de polyacrylamide d'hémoglobines de Kouri (A, ABx, AB et B) et témoins (ACt et ABt). L'échantillon ABx représente l'animal porteur d'une hémoglobine différenciée de HbC, sans doute s'agit-t-il de la persistance d'HbF bien que l'animal ait plus de 2 mois. On remarquera la bonne séparation des hémoglobines A et C.

TABLEAU N° III

Comparaison des taux de protéines sériques sur des fractions séparées à partir de 167 sérums et de 155 plasmas.

Protéines caractérisant la zone de migration électrophorétique	Pourcentage moyen à partir de plasmas	Pourcentage moyen à partir de sérums	Pourcentage moyen à partir des 344 échantillons de sérums et de plasmas
Albumine	35,17	34,59	<u>34,89</u>
Globuline α	14,72	14,84	<u>14,78</u>
Globuline β	25,79	<u>22,63</u>	24,26
Globuline γ	24,32	<u>28,03</u>	26,12
Rapport A/G	0,556	0,541	<u>0,549</u>

Les valeurs que l'analyse statistique permet de retenir sont soulignées, on les retrouve dans le tableau n° IV.

La méthode employée pour ces déterminations, appliquée aux constituants de sérums étalons qui sont analysés à chaque fois avec les échantillons, permet de chiffrer la régularité des manipulations (tableau V).

3. Etude des autres constituants du sérum

Les résultats sont résumés dans les tableaux VI pour les plasmas et VII pour les sérums.

IV. DISCUSSION

Ces premiers résultats constituent une base. Elle doit permettre de suivre et d'orienter une éventuelle sélection de bovins Kouri en vue de constituer un noyau d'animaux. Cette race semble avoir de puissantes potentialités dans le cadre de son adaptation à un biotope particulier. C'est dire que tout travail sur cette race passe maintenant par la constitution d'un

TABLEAU N° IV

Taux des protéines sériques des taurins de race Kouri séparées par électrophorèse sur acétate de cellulose gélatineux phoroslide.

Protéines	Pourcentage moyen	Intervalle de confiance à 5 p.100	Nombre d'analyses
Albumine	34,89	34,18 à 35,60	344
Globuline α	14,78	14,36 à 15,19	344
Globuline β	22,63	21,12 à 24,15	167
Globuline γ	28,03	26,50 à 29,46	167
Total	100,33		
Rapport A/G	0,549	0,529 à 0,569	344

TABLEAU N° V

Résultats des électrophorèses de sérum étalon sur acétate de cellulose phoroslide.

Nature de la détermination	Pourcentage moyen dosé dans le sérum étalon	Nombre de déterminations	Ecart type	Taux réel du sérum étalon
Albumine	62,56	48	1,69	65,4
Globuline α	12,40	48	1,88	13,7
Globuline β	11,73	48	2,09	9,4
Globuline γ	12,90	48	2,45	11,5
Rapport A/G	1,67	48	0,12	1,90

Ce qu'il faut rechercher c'est non pas l'écart constaté avec les quantités figurant dans le sérum étalon mais la bonne reproductibilité des 48 déterminations, donc la valeur de l'écart type pour l'ensemble des déterminations témoins qui ont accompagné l'étude des 344 échantillons.

TABLEAU N° VI

Analyse d'éléments du plasma des bovins Kouri

Nature de la détermination	Nombre d'échantillons	Moyenne des déterminations	Intervalle de confiance à 5 p.100
Protéines totales	171	73,23 g/l	71,97 à 74,36
Azote total	171	11,54 g/l	10,89 à 11,42
Pression osmotique	152	302,3 mosmole	297,3 à 307,2
Cholestérol total	167	1,077 mg/ml	1,028 à 1,125
Na ⁺	107	3,17 mg/ml	3,14 à 3,21
Mg ⁺⁺	105	25,56 mg/l	24,96 à 26,17

troupeau d'animaux de race pure qui pourront être suivis sur plusieurs générations. L'apparition d'hémoglobine C en cours de sélection doit tout de suite attirer l'attention et amener à des recherches poussées sur la lignée correspondante. Cette lignée ne sera d'ailleurs pas à écarter systématiquement, car l'hémoglobine C est sans doute liée à des propriétés biologiques intéressantes en climat tropical; mais elles ne

sont pas encore, actuellement, déterminées. Une souche d'animaux à haute fréquence en Hb C, sélectionnée parallèlement à une autre n'en comportant pas, accroîtrait considérablement les chances d'éclaircir le rôle de cette hémoglobine assez typiquement africaine. On sait, en effet, que la molécule de globine liée à l'hème est constituée chez les bovins par 2 paires de chaînes d'acides aminés, toujours 2 chaînes α

TABLEAU N° VII

Analyse d'éléments du sérum chez les bovins Kouri

Nature de la détermination	Nombre d'échantillons	Moyenne des déterminations	Intervalle de confiance à 5 p.100
Protéines totales	173	71,36 g/l	70,35 à 72,37
Azote total	173	10,75 g/l	9,96 à 11,54
Cholestérol total	169	1,16 mg/ml	1,11 à 1,21
Na ⁺	173	3,34 mg/ml	3,32 à 3,37
Mg ⁺⁺	123	23,47 mg/ml	22,80 à 24,14
K ⁺	173	0,220 mg/ml	0,215 à 0,225
Ca ⁺⁺	165	0,313 mg/ml	0,270 à 0,356

et 2 chaînes β ou 2 chaînes γ pour l'hémoglobine F des nouveau-nés.

Les hémoglobines bovines adultes (A, B, C, D et Khillari) diffèrent seulement par leurs chaînes β , les chaînes α étant identiques. Ces chaînes α bovines sont caractérisées par l'absence de cystéine. Les différences entre les chaînes β des hémoglobines A et B tiennent à 3 acides aminés qui sont différents dans les positions 16, 19 et 120 (il y a 145 acides aminés par chaîne β).

En ce qui concerne les protéines sériques, on remarque le taux élevé des globulines comparé à celui des albumines. Ce taux semble un des facteurs de l'adaptation de ces animaux au lac Tchad, puisqu'il est le reflet de réactions immunitaires relativement importantes à l'état normal.

Les critères déterminés dans ce travail et qui semblent à retenir pour les sérums des bovins Kouri sont rassemblés dans un tableau unique (tableau VIII).

TABLEAU N° VIII

Ensemble des caractères déterminés et retenus pour les hématies et le sérum des taurins de race Kouri

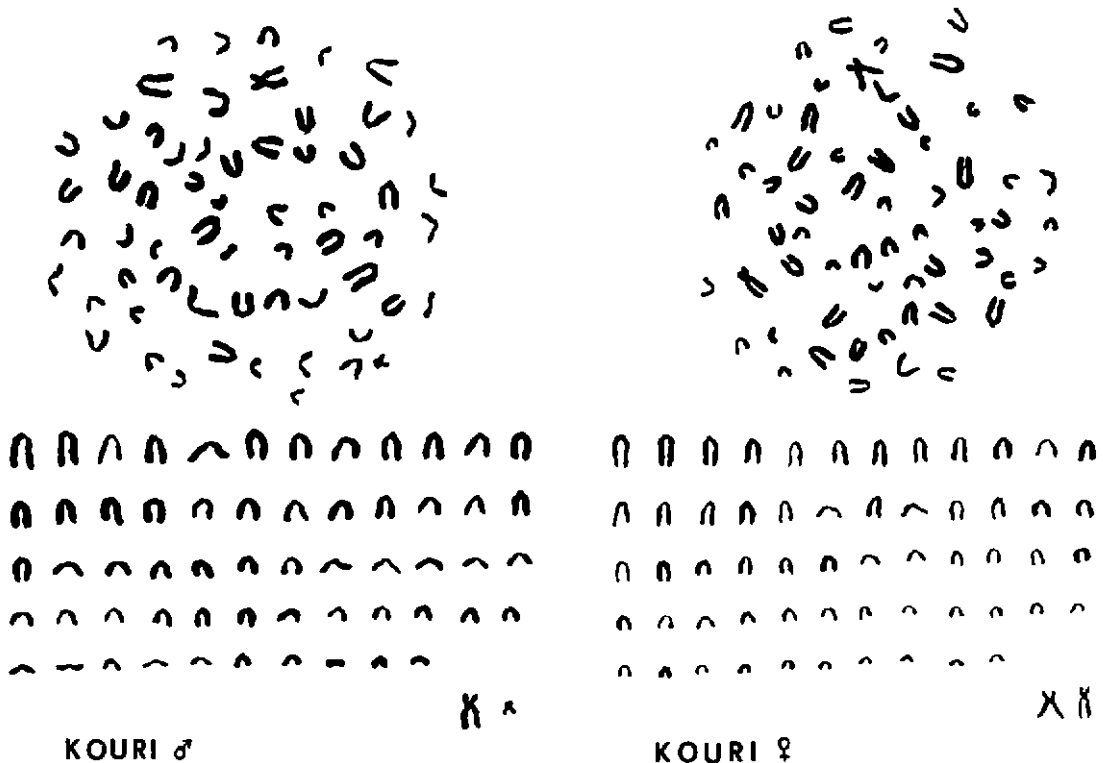
Critères	Valeur moyenne	Nombre de déterminations	Intervalle de confiance à 5 p.100
Fréquence Hb ^A	0,62	344	0,57 à 0,67
Fréquence Hb ^B	0,38	344	0,33 à 0,43
Albumine	34,89 p.100	344	34,18 à 35,60
Globuline α	14,78 "	344	14,36 à 15,19
Globuline β	22,63 "	167	21,12 à 24,15
Globuline γ	28,03 "	167	26,60 à 29,46
Rapport A/G	0,549	344	0,529 à 0,569
Protéines totales	71,76 g/l	173	70,35 à 72,37
Cholestérol total	1,16 mg/ml	169	1,11 à 1,21
Na ⁺	3,34 mg/ml	173	3,32 à 3,37
K ⁺	23,47 mg/ml	123	22,80 à 24,14
Mg ⁺⁺	0,220 mg/ml	173	0,215 à 0,225
Ca ⁺⁺	0,313 mg/ml	165	0,270 à 0,356

V. CONCLUSIONS

L'ensemble des déterminations réalisées dans cette série d'articles doit aider au choix des premiers reproducteurs par la constitution d'une véritable « image » de cette population bovine.

Dans un premier temps, on devra rester fidèle à cette image, si l'on veut réserver l'avenir. Ainsi serait constitué un véritable troupeau de référence à partir duquel la race pourrait être valablement « travaillée » dans différentes directions.

L'image qu'on réussira à obtenir de cette population est particulièrement intéressante puisque, sur les clichés (2) du caryotype d'une femelle et d'un mâle Kouri, on peut aisément contrôler qu'il s'agit bien d'animaux appartenant au sous-genre *Taurinae*, analogue aux bovins de descendance européenne (*Bos taurus typicus*). On a bien, en effet, une formule chromosomique $2n = 60$ et le chromosome Y est un petit chromosome métacentrique alors qu'il est acrocentrique chez le zébu (*Bos taurus indicus*) (7, 3, 5).



Cliché : Laboratoire de Cytogénétique - E.N.V.T.

Fig. 2. — Caryogrammes de bovins de race Kouri (mâle et femelle) aimablement communiqués par le Professeur QUEINNEC, docteur vétérinaire titulaire de la chaire de Zootechnie à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, réalisés par le docteur vétérinaire Roland DARRE, assistant à la chaire de Zootechnie. On retrouve la formule classique des taurins $2n = 60$ et la particularité du chromosome sexuel chez le mâle. Phénotypiquement les bovins choisis pour le prélèvement étaient Kouri, mais il semble indispensable d'effectuer de nombreux caryogrammes d'animaux typiques de la race Kouri pour connaître l'homogénéité de leurs caryogrammes.

SUMMARY

The Kouri : A cattle breed from lake Chad
II. Biochemical study : Hemoglobins and factors of sera

Believing to a serie, the purpose of which is to increase our knowledge about kouri breed, this second paper is concerning biochemical and genetical aspects of some blood components of this breed.

With fast and good carriage conditions, blood samples allow us to analysed hemoglobin with determination of gene frequencies, of serum proteins, of whole proteins, of osmotic pressure of whole cholesterol and of ions Na^+ , K^+ , Mg^{++} et Ca^{++} . The results of analyses with 344 animals selected among the most representative of them, allow to give biochemical standards for the bovine Kouri population.

One can see the absence of Hb C among this 344 animals.

One of them has a non identified hemoglobin, but different from A, B or C. Serums proteins have the same rate as the lower of it found in serum of european cattle.

Finally it must be said that Kouri cattle are really *Bos taurus typicus* as it is demonstrated by their caryotype. They differ from *Bos taurus indicus* in Y chromosome which is really metacentric in Kouri cattle.

RESUMEN

El « Kouri » : raza bovina del lago Chad
II. Estudio bioquímico : las hemoglobinas y los constituyentes del suero

Es el segundo artículo sobre la raza bovina « Kouri ». Se trata del aspecto bioquímico y genético de las constantes sanguíneas de dicha raza.

Rápidamente y adecuadamente transportadas, las muestras de sangre permiten el analisis de las hemoglobinas con determinación de las frecuencias genicas, de las proteínas sericas, de las proteínas totales, de la presión osmótica, del colesterol total y de los iones Na^+ , K^+ , Mg^{++} y Ca^{++} . Según el examen de las muestras proviniendo de 344 animales elegidos entre los más representativos, se indican normas bioquímicas para los bovinos Kouri.

Se nota la ausencia de hemoglobina C en estos 344 animales. Uno de ellos presenta una hemoglobina no identificada sino distinta de A, B o C. La cantidad de las proteínas sericas es igual a la tasa limite inferior encontrada en los bovinos europeos.

Los « Kouri » pertenecen bien al tipo *Bos taurus typicus*; lo que esta mostrado por su cariotipo que difiere del de *Bos taurus indicus* (Cebú) : su cromosoma Y es metacéntrico mientras el de los cebus es acrocéntrico.

BIBLIOGRAPHIE

1. ARDRY (R.). Le dosage des protéines par la réaction du Biuret. Détermination d'un coefficient spécifique d'absorption. *Ann. Biol. clin.*, 1960, **28** (3-4) : 214-222.
2. E.N.V.T., laboratoire de cytogénétique. Communication personnelle du Professeur QUEINNEC et du Docteur Vétérinaire Roland DARRÉ.
3. EPSTEIN (H.). Studies on the relationships between the breeds in Africa, Asia and Europ. *World Rev. Anim. Prod.*, 1972, **8** : 1.
4. FISCHER (H.). Détermination des caryotypes chez les animaux domestiques et sauvages dans l'Asie du Sud-Est. *Colloque Franco-allemand. I.E.M.V.T. Maisons-Alfort*, 5-6 décembre 1972.
5. HSU (T.C.) et BERNIRSCHKE (K.). An atlas of Mammalian chromosomes. Vol. 4. Berlin, Heidelberg, New York, Springer, 1967.
6. PETIT (J.-P.). Protocole de récolte et de transport de sang pour l'étude comparée des hémoglobines de taurin et de zébu. Valeur des échantillons ainsi obtenus. *C.R. Symposium int. sur la structure comparée des hémoglobines, Thessalonique*, 11-13 avril 1966 : 122-125.
7. PETIT (J.-P.). Détermination de la nature des hémoglobines chez 982 bovins africains et malgaches (taurins et zébus) par électrophorèse sur acétate de cellulose. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1968, **21** (3) : 405-413.
8. PETIT (J.-P.). Théorie et pratique des mesures de la pression osmotique par cryométrie. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1970, **23** (4) : 479-491.
9. PETIT (J.-P.). Les dosages biologiques en médecine vétérinaire. *Symbioses*, 1971, **3** (4) : 235-264.
10. QUEVAL (R.), PETIT (J.-P.), TACHER (G.), PROVOST (A.) et PAGOT (J.). Le Kouri : race bovine du Lac Tchad. I. Introduction générale à son étude zootechnique et biochimique : origines et écologie de la race. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1971, **24** (4) : 667-687.
11. QUEVAL (R.) et PETIT (J.-P.). Le Kouri : race bovine du lac Tchad. III. Les facteurs erythrocytaires. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.* (à paraître).