

# Analyse génétique et relations phylogénétiques du cheval Barbe par l'utilisation des microsatellites

M. PIRO<sup>1</sup>, H. ALYAKINE<sup>1</sup>, M. EZZAOUIA<sup>2</sup>, F. LASFAR<sup>2</sup>, H. OULED AHMED<sup>2</sup>, L. OURAGH<sup>1</sup>

(Reçu le 09/12/2018; Accepté le 20/02/2019)

## Résumé

Ce travail s'est intéressé à la comparaison génétique entre les chevaux Barbes du Maroc et de Tunisie et à l'établissement des relations phylogénétiques entre le cheval Barbe et les autres races de chevaux existantes au Maroc par l'utilisation des microsatellites. Premièrement, 100 chevaux barbes marocains et 100 tunisiens ont été utilisés et les indices de la variabilité intra et inter-population ont été évalués. 133 allèles ont été détectés pour le Barbe marocain contre 125 pour le tunisien. Le NMA était de 7,29 et 7,82 respectivement chez le Barbe tunisien et marocain. Les taux d'hétérozygotie moyens étaient presque similaires chez les deux populations. Le Fst était de 0,0454 et 0,0780 respectivement chez le Barbe de Tunisie et du Maroc. Le Gst était très faible et la distance génétique de Nei était de 0,05. Les deux populations sont donc hétérogènes et pratiquement identiques. 86,5 % des individus étudiés ont été affecté convenablement à leur population d'origine. Deuxièmement, 50 chevaux Arabe, 50 Arabe-Barbe et 50 Pur-Sang, en plus des 200 chevaux Barbes préalablement étudiés ont été utilisés. Le cheval barbe a présenté des allèles spécifiques et une forte hétérozygotie avec une distance génétique maximale avec le Pur-Sang. L'arbre phylogénétique a montré, un regroupement très significatif entre les deux populations Barbes d'un côté et les trois autres races de l'autre.

**Mots-clés:** Cheval, Barbe, analyse génétique, microsatellites, indices de variabilité génétique, arbre phylogénétique.

## Genetic analysis and phylogenetic relationships of the Barb horse through the use of microsatellites

### Abstract

The aim of this study was to compare genetically Moroccan (MA) and Tunisian (TN) Barb horses and to establish the phylogenetic relation between Barb horse and other horse breeds in Morocco by using microsatellites. First, 100 Moroccan barb and 100 Tunisian Barb horses were used. Genetic variability index between and inside the populations were estimated. 133 alleles were detected in the Moroccan population and 125 in the Tunisian. The mean number of alleles was 7.29 and 7.82 respectively for the Tunisian and Moroccan barb horse. The heterozygosity was almost similar in the two groups of Barb horses (TN = 0.716 and MA = 0.714). Fst was estimated at 0.0454 and 0.0780 respectively for TN and MA Barb horses. The Gst was also estimated at 0.012 and the Nei genetic distance at 0.05. The two populations are almost genetically similar and heterogeneous. Finally, 86,5 % of horses were correctly affected to their likelihood population. Secondly, 50 Arabian horses, 50 Arabian-Barb and 50 thoroughbreds and the 200 Barb horses previously studied were used to establish the phylogenetic relationships. The use of 17 microsatellites showed that the Barb horses had specific alleles and the highest heterozygosity and the highest genetic distances were combined with thoroughbred. The two Barb horse populations were highly combined in one side of the phylogenetic tree.

**Keywords:** Horse, barb, genetic analysis, microsatellites, genetic index, phylogenetic tree.

## INTRODUCTION

Le berceau du cheval Barbe est l'Afrique du Nord (Maghreb). Il est le produit du hasard des rencontres géo-historiques, de l'adaptation aux conditions climatiques et de l'utilisation (Gaudois, 1987). Le cheval Barbe est l'une des races les plus anciennes au monde (découverte d'ossement de plus de 4000 ans). Son origine est très controversée. Certains le désignent comme une race particulière provenant du centre Est de l'Afrique, d'autres ont proposé une origine orientale où les populations berbères domestiquèrent cette race et l'emmenèrent au gré de leur conquêtes et migrations avant de venir s'installer au Maghreb (Lassère, 1991). D'autres encore lui ont avancé l'hypothèse d'une origine mongole et qu'il se serait différencié en race distincte sous l'influence des biotopes et

de la sélection opérée par les peuples qui l'ont domestiqué (Aureggio, 1915).

L'hypothèse la plus probable reste celle qui considère le cheval Barbe comme le produit de croisement de plusieurs races chevalines grâce à la position géographique de l'Afrique du Nord et les différents événements qu'elle a connus au fil des années

Son introduction en Europe a lieu dans les temps modernes, à partir du VIII<sup>ème</sup> siècle par les forces musulmanes, où il acquiert une très bonne réputation grâce à son endurance, sa frugalité, son aptitude au dressage : d'où son utilisation en tant que cheval militaire. D'ailleurs la sélection sévère de ses qualités foncières a abouti à la création du Pur-Sang Anglais. Il est également à l'origine du Quater Horse suite au croisement avec des chevaux de courses par les anglais

<sup>1</sup> Département de Médecine, Chirurgie et Reproduction, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc, Correspondance: m.piro@iav.ac.ma

<sup>2</sup> FNARC, Tunisie

au XV<sup>ème</sup> siècle. La création du 1<sup>er</sup> Stud-book a eu lieu en 1886 en Algérie.

Actuellement, en Afrique et en particulier dans les pays du berceau de la race, les méthodes et les moyens d'un élevage moderne, contrôlé et encouragé, sont mis à la disposition de la race Barbe. Dans ce cadre, la Société Royale d'Encouragement du Cheval et le Ministère de l'agriculture et de la pêche maritime ont donné une part très importante à cette race au niveau de la stratégie de développement de l'élevage équin au Maroc.

Aussi, le standard de la race Barbe a été établis par l'Organisation Mondiale du Cheval Barbe (OMCB) créée en 1987 et regroupant les pays du Maghreb («pays berceaux» de la race) possédant le plus grand effectif de chevaux Barbes: Maroc, Algérie et Tunisie. Mais également certains pays d'Europe amateurs de cette race : la France via l'Association Française du Cheval Barbe (AFCB), l'Allemagne, la Belgique et la Suisse (en 2004).

Le cheval Barbe est réputé pour être docile, rustique et très polyvalent. Son tempérament est fiable, calme, doux, courageux faisant de lui un parfait cheval d'instruction. C'est un cheval endurant et rapide très bien adapté aux sports équestres (que ce soit le dressage, l'endurance, la course, le saut d'obstacles, les raids ...).

Cette étude a pour objectif de comparer sur le plan génétique les chevaux Barbes du Maroc et de Tunisie, puis d'étudier les relations qui existent entre ces derniers et d'autres races de chevaux (Pur-sang Anglais, Arabes et Arabe-Barbes), en se basant sur l'utilisation des microsatellites.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Ce travail a été réalisé dans un premier temps sur deux populations de race Barbe originaire de Tunisie et du Maroc. L'effectif total de l'échantillon étudié était de 100 chevaux par pays. Cent échantillons de sang de chevaux de race Barbe nous ont été envoyés de Tunisie par la FNARC (Fondation Nationale d'Amélioration de la Race Chevaline).

Dans la deuxième partie de ce travail, pour la comparaison entre les chevaux Barbes et d'autres races équines existantes au Maroc, 150 individus issus des races suivantes: 50 Arabes, 50 Pur-Sang, et 50 Arabe-Barbes ont été utilisés en ayant recours aux données de génotypage enregistrées dans les bases de données du Laboratoire d'Analyses Génétiques Vétérinaires de l'IAV Hassan II. Seul les individus non apparentés et provenant de différentes régions du Maroc ont été choisis.

### Extraction de l'ADN

Les prélèvements ont été réalisés à partir de la veine jugulaire sur des tubes de 5 ml sous vide contenant l'EDTA.

Les génotypages ont été réalisés au Laboratoire d'Analyses Génétiques Vétérinaires (LAGEV) de l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II. L'extraction de l'ADN à partir du sang prélevé a été réalisée à l'aide de la technique combinant la lyse des globules rouge par le NaCl-EDTA (NE) et une lyse alcaline des globules blancs

par le NaOH. Par la suite la suspension a été neutralisée par une solution de TrisHCl (HCl 200 Mm et tris 100 Mm) et le PH de chaque échantillon a été vérifié. Il est aussi nécessaire de vérifier la concentration en ADN, réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre (Eppendorf Biophotometer) sur 10 % des échantillons choisis au hasard.

### PCR et analyse de l'amplifiât

La PCR a été réalisée par l'amplification de 17 microsatellites utilisés en routine pour l'identification et le contrôle de filiation des chevaux. L'amplification de l'ADN a été réalisée en utilisant le Kit de typage StockMarks pour chevaux (PE Applied Biosystems, Foster City, Californie, USA) qui comprend des amorces marquées par des fluorophores.

La PCR était réalisée dans un thermocycleur (Applied Biosystems Thermal Cycler, GeneAmp PCR system 2700) pendant 3 h, durée moyenne nécessaire pour réaliser 30 cycles.

L'ADN est d'abord dénaturé à 95°C pendant 10 minutes avant de subir les 30 cycles d'amplification. L'extension finale dure 60 minutes à 72°C afin d'optimiser l'action de la Taq polymérase.

Après PCR, l'amplifiât est analysé par électrophorèse capillaire en utilisant le système d'analyse génétique ABI PRISM 3130 après ajout du standard de taille ROX 350. L'analyse des résultats de l'électrophorèse a été effectuée à l'aide du logiciel GENEMAPER (PE Applied Biosystems, Foster City, Californie, USA).

### Analyses statistiques des données

Les variabilités génétiques intra-population et inter-population ont été évaluées.

Les paramètres de la diversité génétique intra-population (nombre d'allèles par locus, taux d'hétérozygotie observé et attendu sous l'hypothèse de Hardy-Weinberg) ont été calculés à l'aide du logiciel GENETIX version 4.05.2 (Belkhir *et al.*, 2004).

La diversité génétique inter-population a été évaluée par le calcul des distances génétiques (distance de Nei 1978, et de Cavalli Sforza et Edwards) et le coefficient de différenciation génétique G<sub>st</sub> de Nei calculé à l'aide du logiciel GENETIX 4.05.2 (Belkhir *et al.*, 2004).

La méthode AFC a été réalisée par l'utilisation du logiciel GENETIX 4.05.2 (Belkhir *et al.*, 2004).

Les indices de fixation pour chaque locus ont été obtenus à l'aide des macros préparées sur EXCEL par Bertrand Bed'hom (unité mixte de Génétique et de Diversité animale. INRA Jouy-en Josas, France).

Les probabilités d'affectation des individus à leur population ont été calculées à l'aide du logiciel GeneClass version 2.0 (Piry *et al.*, 2004). Ce logiciel est basé sur une approche Bayésienne partielle. Le logiciel Structure 2.3.X (Hubisz *et al.*, 2009) a été utilisé pour la réalisation du graphique montrant le degré de similarité entre les populations. Le logiciel Structure est basé sur une approche Bayésienne totale, elle utilise la création de groupe et l'essai d'affectation de chaque individu au groupe le plus probable.

L'arbre phylogénétique par la méthode Neighbor Joining a été construit par l'utilisation du logiciel Population version 1.2.28 (Lagella, 2000) et Treeview version 1.6.6 (Page, 2001) pour déterminer les relations phylogénétiques entre les chevaux Barbes et les autres races de chevaux existant au Maroc.

## RÉSULTATS DE L'ÉTUDE COMPARATIVE ENTRE LES CHEVAUX BARBES DU MAROC ET DE LA TUNISIE

### Variabilité intra-population

La variabilité intra-population a été évaluée par le calcul des fréquences allélique et l'estimation de l'hétérozygotie. Sur les 200 sujets analysés répartis en deux populations (Tunisie et Maroc), un total de 137 allèles était détecté. La population Barbe du Maroc présente plus d'allèles; 133 contre 125 pour le Barbe de Tunisie. Le nombre moyen d'allèles par locus est de 7,2941 pour la population tunisienne et de 7,8235 pour la population marocaine. Tous les loci sont polymorphes, le locus montrant le plus faible nombre d'allèles est le locus HTG7 pour la population tunisienne avec seulement 4 allèles, alors qu'il s'agit des loci HTG6 et HTG7 pour la population marocaine avec 5 allèles.

Les systèmes les plus polymorphes sont les microsatellites ASB17, HMS2, HTG10 et le VHL20. La distribution des allèles présente une très légère variation à l'intérieur des deux populations étudiées: les nombres d'allèles pour chaque locus sont proches avec une variation d'un ou deux allèles.

Les fréquences alléliques calculées varient de 0,005 dans la population tunisienne pour 6 microsatellites (ASB17, ASB2, CA425, HMS3, HMS6, VHL20) respectivement pour les allèles 121, 240, 240, 157, 163, 89 et également dans la population marocaine pour 8 microsatellites, à 0,7550 dans les deux populations pour l'allèle 125 du microsatellite HTG7.

Certains allèles ont été retrouvés spécifiquement chez une des deux populations, tels que les allèles: 151, 155, 159 pour le microsatellite AHT4 avec les fréquences de 0,0300; 0,0250 et 0,0050 respectivement. Il existe aussi des allèles à fréquence plus élevée chez une population par rapport à l'autre tel que les allèles 101 (TN : 0,1150 ; MA: 0,0050) et 119 (TN: 0,1850; MA : 0,3750) pour le microsatellite ASB17.

Les loci qui présentent les taux d'hétérozygotie les plus élevés chez les deux populations sont les microsatellites les plus polymorphes, à savoir ASB17, VHL20 et AHT4. Les populations tunisienne et marocaine présentent des taux d'hétérozygotie moyens attendus presque similaires (Hexp de 0,7162 et 0,7145).

Les taux d'hétérozygotie moyens observés sont plus faibles que les taux d'hétérozygotie moyens attendus : Hobs est de 0.6835 et 0.6582 respectivement pour la Tunisie et le Maroc.

Les taux d'hétérozygoties moyens observés et attendus sont très élevés, cela indique une grande hétérogénéité de l'échantillon étudié. Ainsi 71,6 % des chevaux Barbes

tunisiens et 71,4 % des chevaux Barbes marocains sont hétérozygotes, cela veut dire que 7 individus sur 10 sont hétérozygotes pour les 17 systèmes étudiés. Ceci prouve qu'il y a une grande diversité et une grande hétérogénéité intra-population.

### Variabilité inter-population

Pour estimer la variabilité entre les deux populations de Barbe étudiées, les paramètres suivants ont été calculés:

- L'indice de fixation (statistique F): permet de mesurer la perte d'hétérozygotie dans des croisements présentant une certaine part de consanguinité. Pour les deux populations étudiées, les indices de fixation moyens pour les 17 systèmes analysés sont respectivement de 0,0454 et 0,0780 pour la population tunisienne et la population marocaine. Cela indique que les deux populations Barbes sont fortement hétérozygotes.

- Le coefficient de différenciation génétique G<sub>st</sub>: sert à estimer le niveau de la différenciation entre les populations étudiées, il varie de 0 à 1 et indique la part de la variabilité totale au sein de ces populations.

Le coefficient de différenciation génétique de Nei, G<sub>st</sub> (Nei 1978) entre les deux populations de Barbes à l'aide de 17 microsatellites est de 0.0120 et le coefficient non biaisé selon Nei and Chesser (1983) est de 0.0094.

La valeur de G<sub>st</sub> obtenue entre la population montre que seul 1,2% de variabilité peut être expliquée par les 17 marqueurs utilisés

Le locus qui a le plus grand G<sub>st</sub> est HMS6 (0,0370) et le locus qui a le plus petit G<sub>st</sub> est AHT5 (0,0018).

- La distance génétique de Nei 1978: a été estimée pour analyser la ressemblance entre la population Barbe de Tunisie et celle du Maroc. Cette distance est de 0,05 ce qui confirme que ces deux populations sont pratiquement identiques.

- Analyse factorielle des correspondances (AFC): permet de décrire la situation des individus entre eux et au sein des deux populations étudiées afin d'avoir plus d'informations sur la structure génétique de chaque population. L'AFC a été appliqué en utilisant les données génotypiques individuelles pour produire les représentations graphiques en 3 dimensions (Figure 1). La différence sur l'axe horizontal (axe 1) est expliquée à 100% par les marqueurs utilisés.

Les individus de la population tunisienne sont indiqués en bleu et ceux de la population Marocaine en jaune. Les deux populations forment deux groupes de nuages de points distincts avec quelques individus mélangés.

- Affectation d'un individu à sa population: Afin de tester la probabilité d'affectation des individus de l'échantillon étudié à leur population d'origine et mesurer le pourcentage des bons regroupements, l'affectation de chaque individu à sa population à l'aide du logiciel GeneClass version 2.0 (Piry *et al.*, 2004) a été évaluée.

La probabilité pour qu'un individu soit attribué à sa population est très élevée pour l'ensemble de la population sauf pour 27 individus qui ne sont pas affectés à leur population

d'origine. Les individus bien classés (173) représentent 86,5 % de l'effectif total et l'indice de qualité est de 84,5 % pour les deux populations.

Au niveau de la population Barbe marocaine, l'intervalle des pourcentages des bonnes affectations est de 72,6 à 100 %, celui des mauvaises affectations varie entre 51,1% et 99,9%.

Au niveau de la population Barbe tunisienne, les bonnes affectations ont des pourcentages qui varient entre 51,9 et 100 %. Quant aux mauvaises affectations, elles sont limitées dans un intervalle de 53,9 à 99,3 %.

## RÉSULTATS DE L'ÉTUDE COMPARATIVE ENTRE LES CHEVAUX BARBE ET D'AUTRES RACES DE CHEVAUX

Les relations phylogénétiques entre le cheval Barbe et d'autres races de chevaux (Pur-Sang, Arabe et Arabe Barbe), ont été étudiés en utilisant les résultats de génotypage à l'aide des 17 microsatellites et par le calcul des indicateurs de la variabilité intra et inter-populations.

### Variabilité intra-population

Le calcul des fréquences alléliques a permis de mettre en évidence la présence de certains allèles chez les populations Arabe, Arabe-Barbe et Pur-Sang et leur absence chez le cheval Barbe tunisien et marocain (ex: allèles 126/ 130/ 132/ 136 du microsatellite AHT4 et l'allèle 222 du microsatellite ASB2).

De même, certains allèles ne sont présents que chez la race Barbe (ex : allèles 143/ 145/ 147/ 149/ 157 du microsatellite AHT4). On note aussi la présence d'allèles spécifiques à une seule population (les allèles 127/ 141/ 143 du locus AHT5 chez la race Arabe, l'allèle 153 du

locus AHT4 chez la population Barbe tunisienne, l'allèle 218 du locus ASB2 chez la race Pur-sang Anglais...).

Le Barbe a aussi des allèles communs avec une seule race des autres races de chevaux (Arabe, Arabe-Barbe ou Pur-sang Anglais), spécialement le cheval Arabe-Barbe avec, entre autres, l'allèle 101 du locus ASB17, l'allèle 99 du locus VHL20, les allèles 163 et 169 du locus HMS6.

### Variabilité inter-population

#### Indice de fixation (Fst)

Pour les 5 populations de chevaux, les indices de fixation pour les 17 systèmes analysés ont été calculés. Selon les résultats obtenus, les populations Barbe et Arabe-Barbe sont les plus hétérozygotes, ceci est particulièrement vu chez le cheval Barbe marocain avec un Fst de 0,0779. La population la moins hétérozygote est la population Pur-sang Anglais avec un Fst de 0,0250

#### Coefficient de différenciation génétique Gst

Les coefficients de différenciation génétique de Nei, Gst (Nei 1978) entre les cinq populations de chevaux à l'aide des 17 microsatellites sont représentés dans le tableau 1.

Les microsatellites utilisés ont permis d'expliquer à peu près 5,5 % de la différence entre le cheval Barbe et Pur-sang anglais alors que la valeur minimale a été observée entre les deux populations de Barbe (1,2%) ainsi qu'entre l'Arabe et l'Arabe-Barbe (1,1%).

Le Gst moyen est de 0,0564 et la Gst (nc) est de 0,0449. La différenciation entre les 5 populations est donc expliquée par les 17 microsatellites à hauteur de 5,6%.

Le locus qui a le plus grand Gst est AHT4 avec : Gst =0,2030, alors que celui qui a le plus petit Gst est CA425 avec : Gst =0,0204.

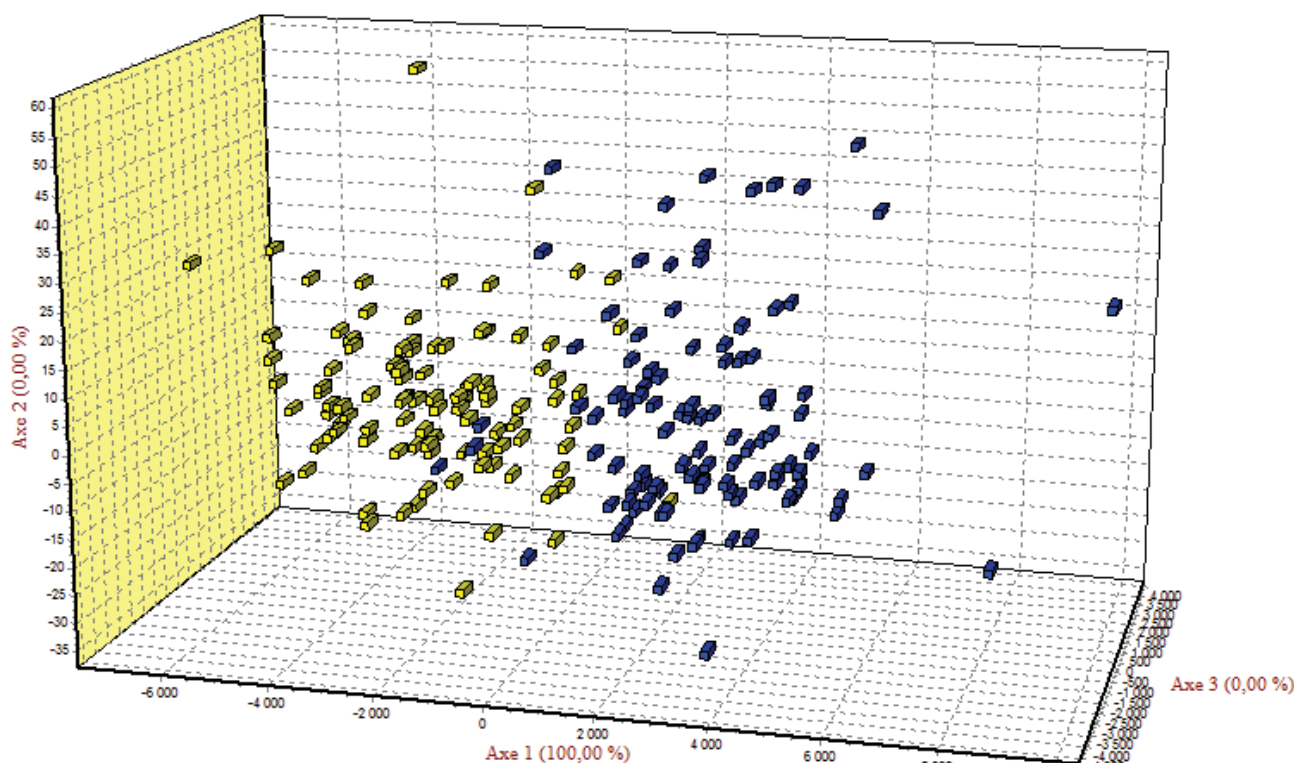


Figure 1: Représentation graphique en trois dimensions des résultats de l'AFC sur les deux populations Barbe

### Distances génétiques

Les tableaux 2 et 3 présentent les distances génétiques entre les 5 populations de chevaux étudiées en utilisant 17 microsatellites (Tableaux 2 et 3).

Le cheval Barbe des deux populations (tunisienne et marocaine) présente une distance minimale avec le cheval Arabe-Barbe. Le cheval Arabe est plus proche du Pur-Sang anglais que du cheval Barbe.

La distance minimale a été retrouvée entre les populations Arabe et Arabe-Barbe (0,031) et la distance maximale entre les populations des chevaux Barbe et Pur-sang Anglais (0,316).

### Analyse factorielle des correspondances (AFC)

Les figures 2 et 3 montrent la distribution des cinq populations de chevaux selon leurs données génotypiques respectivement en 2 et 3 dimensions.

On observe au niveau des deux figures que le nuage de points représentant la population Arabe-Barbe est le plus proche des nuages de points des deux populations Barbes et en position intermédiaire entre ces derniers et celui de la population Arabe. On remarque également que la population Pur-Sang anglais forme un nuage dense, qui est le plus éloigné des nuages des populations Barbes par rapport aux autres races de chevaux.

### Similarités

Pour examiner la structure des populations et le degré de similarités qui existe entre celles-ci, le logiciel Structure 2.3.X (Hubisz *et al.*, 2009) a été utilisé. Ainsi, la matrice de similarités pour les populations étudiées avec les 17 microsatellites analysés est présenté dans la figure 4.

La population la moins consanguine des cinq populations est l'Arabe-Barbe, en revanche, la population la plus consanguine est le Pur-sang Anglais. Les chevaux Arabe et Arabe-Barbe sont assez similaires, les deux populations des chevaux Barbe aussi. Les populations qui se ressemblent le moins sont le Pur-sang Anglais et le Barbe Tunisien.

### Arbre phylogénétique

Pour construire l'arbre phylogénétique qui représente les 5 populations de chevaux deux méthodes différentes ont été utilisées:

- La méthode UPGMA (Sneath et Sokal, 1973) basée sur la distance génétique de Nei (1978) (Figure 5). On remarque que les Barbes de la Tunisie et du Maroc forment un seul groupe distinct soutenu à 70 % par Bootstrap, il existe un autre groupe constitué par l'Arabe et l'Arabe-Barbe, ce regroupement est modérément soutenu par Bootstrap (66 %). Quant au Pur-sang Anglais, il forme à lui seul un groupe qui s'approche de celui du cheval Arabe (valeur de Bootstrap de 66 %).

- La méthode de Neighbor-joining (Saitou et Nei, 1987), basée sur la distance génétique de Cavalli-Sforza et Edwards (1967) (Figure 6).

L'arbre obtenu confirme la présence d'un regroupement entre les Barbes (BeT, BeM) d'un côté et des 3 autres races de l'autre. Ce regroupement est très significatif (valeur de Bootstrap de 99,7 %). Le regroupement entre l'Arabe et le Pur-sang Anglais est soutenu par un pourcentage de bootstrap de 86,1 %. Les deux populations Barbes et le Pur-Sang Anglais sont les plus éloignées.

**Tableau 1: Coefficients de différenciation génétique entre les 5 populations étudiées.**

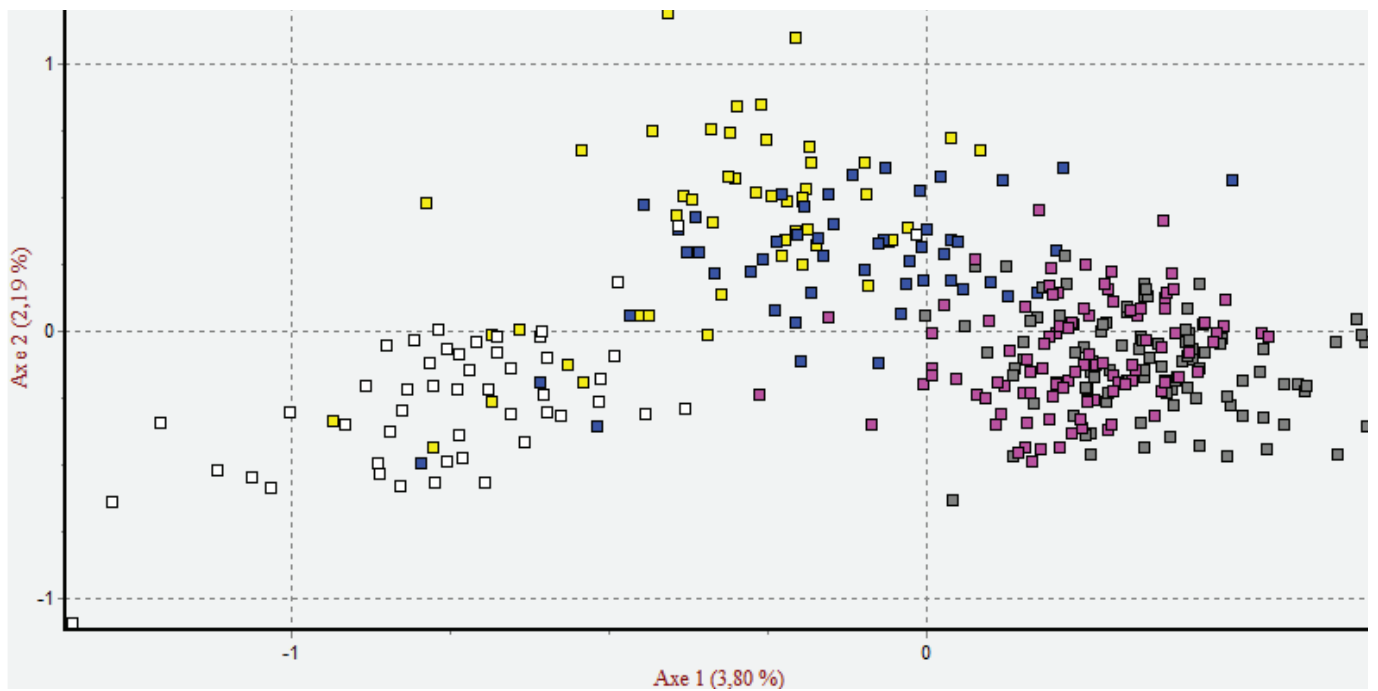
	Arabe	Ar-Be	PS	Be TN	Be MA
Arabe	0	0,0110	0,0333	0,0342	0,0366
Ar-Be	0,0110	0	0,0301	0,0197	0,0243
PS	0,0333	0,0301	0	0,0472	0,0557
Be TN	0,0342	0,0197	0,0472	0	0,0120
Be MA	0,0366	0,0243	0,0557	0,0120	0

**Tableau 2: Distances génétiques de Nei (1978) entre les 5 populations de chevaux**

	Arabe	Ar-Be	PS	Be TN	Be MA
Arabe	0	0,031	0,151	0,186	0,170
Ar-Be	0,031	0	0,141	0,118	0,089
PS	0,151	0,141	0	0,316	0,253
Be TN	0,186	0,118	0,316	0	0,050
Be MA	0,170	0,089	0,253	0,050	0

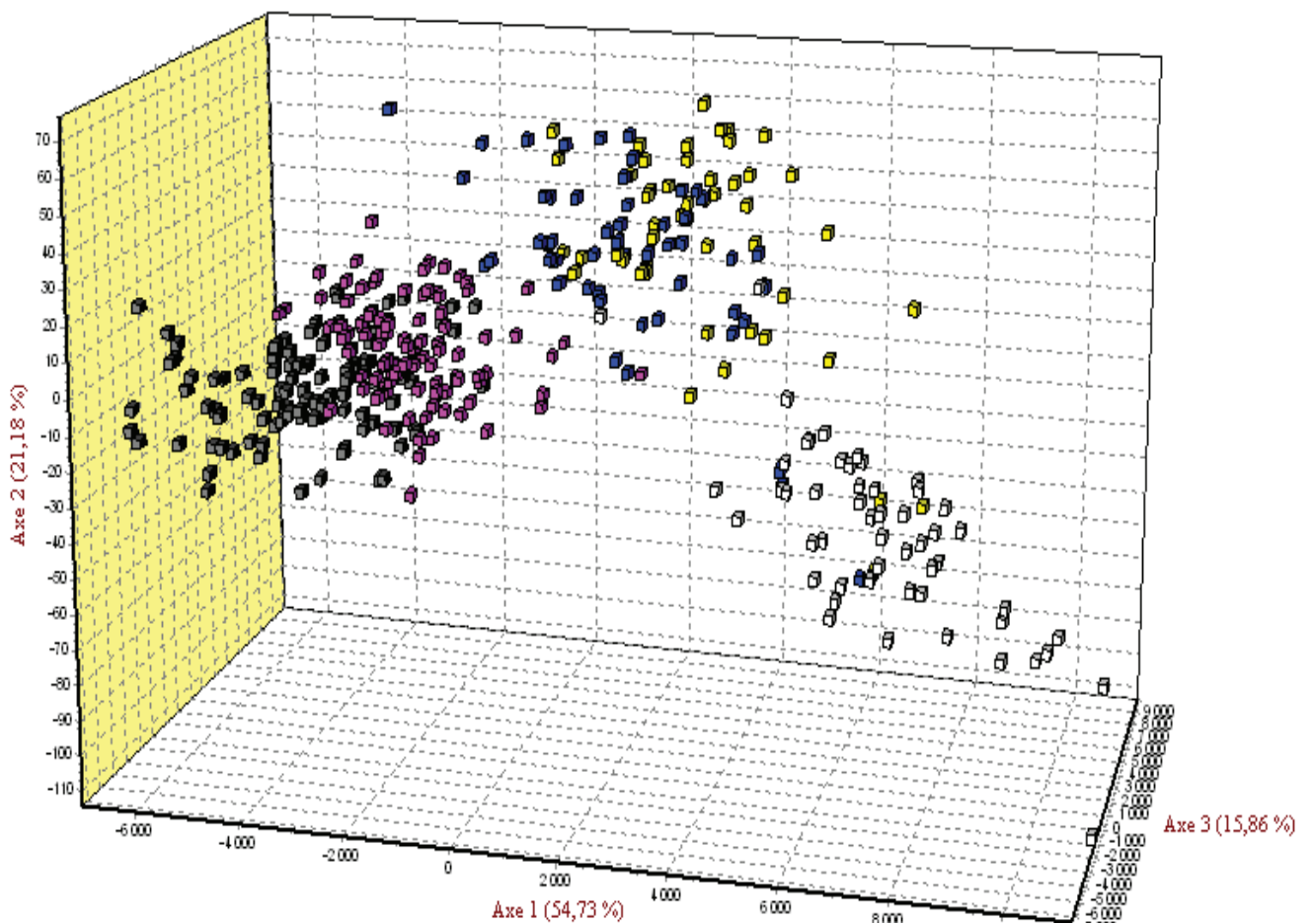
**Tableau 3: Distance génétique de Cavalli-Sforza et Edwards (1967) entre les 5 populations de chevaux.**

	Arabe	Ar-Be	PS	Be TN	Be MA
Arabe	0	0,022	0,040	0,054	0,051
Ar-Be	0,022	0	0,045	0,043	0,036
PS	0,040	0,045	0	0,078	0,070
Be TN	0,054	0,043	0,078	0	0,015
Be MA	0,051	0,036	0,070	0,015	0



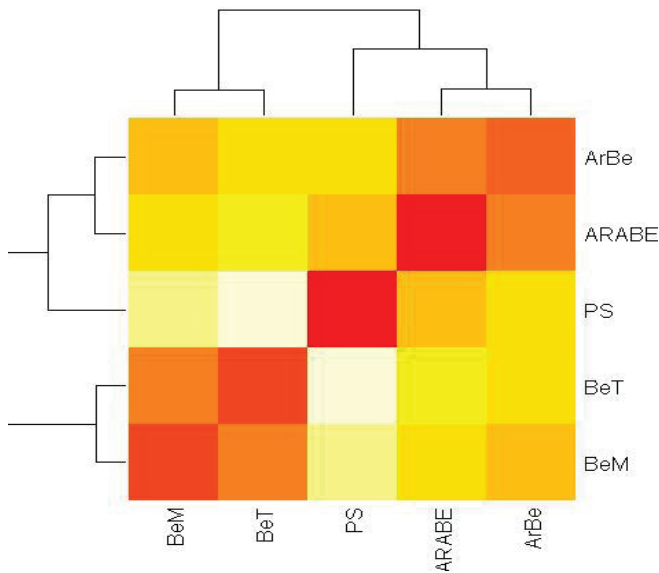
■ Arabe ■ Arabe-Barbe □ Pur-sang Anglais ■ Barbe Tunisie ■ Barbe Maroc

Figure 2: Représentation graphique de l'AFC en deux dimensions des 5 populations



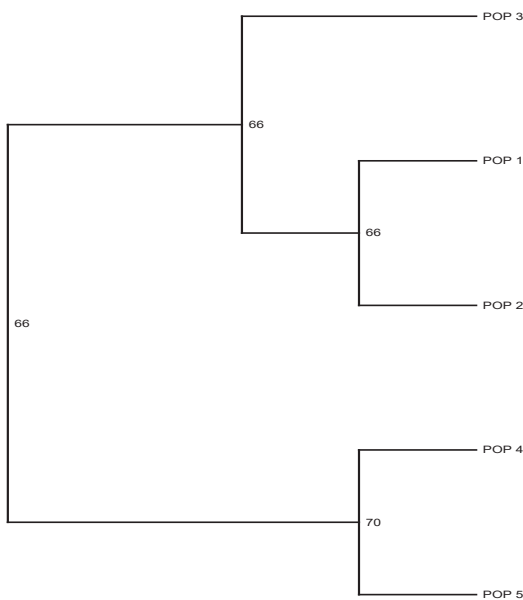
■ Arabe ■ Arabe-Barbe □ Pur-sang Anglais ■ Barbe Tunisie ■ Barbe Maroc

Figure 3: Représentation graphique de l'AFC en trois dimensions des 5 populations



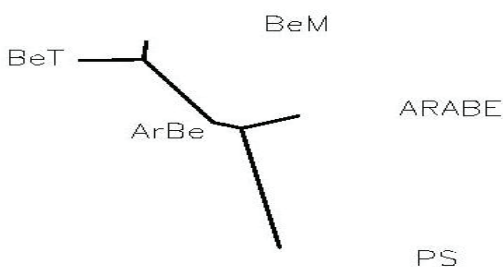
ArBe: Arabe-Barbe, PS: Pur-sang Anglais, BeT: Barbe Tunisie, BeM: Barbe Maroc

Figure 4: Représentation graphique des similarités entre les différentes populations obtenue par le logiciel STRUCTURE



ArBe: Arabe-Barbe, PS: Pur-sang Anglais, BeT: Barbe Tunisie, BeM: Barbe Maroc

Figure 5: Représentation graphique de l'arbre phylogénétique établi par la méthode UPGMA



ArBe: Arabe-Barbe, PS: Pur-sang Anglais, BeT: Barbe Tunisie, BeM: Barbe Maroc

Figure 6: Représentation graphique de l'arbre phylogénétique établi par la méthode de Neighbor-joining

## DISCUSSION

L'objectif principal de ce travail consistait à comparer génétiquement deux populations Barbes (Maroc et Tunisie) par le calcul des paramètres de la variabilité génétique afin d'établir les liens et les différences qui existent entre elles, puis de situer la race Barbe par rapport à d'autres races de chevaux.

### Variabilité du cheval Barbe en Tunisie et au Maroc

Le cheval barbe dans notre étude compte 137 allèles en total, 125 allèles étaient rencontrés chez le Barbe de Tunisie et 133 allèles chez le Barbe Marocain. Les deux populations ont des fréquences alléliques pratiquement identiques à tous les loci. Les microsatellites utilisés sont très polymorphes, le nombre d'allèles moyen au niveau des 17 loci varie de 5 à 14 chez la population marocaine et de 4 à 12 chez la population tunisienne. Le NMA chez les chevaux Danois varie entre 6 et 10 (Thirstrup *et al.*, 2008) et celui des chevaux de la méditerranée occidentale (d'Espagne et d'Italie) est de 6 à 14 allèles (Marletta *et al.*, 2006). Par contre, on trouve une valeur très faible chez la race Portugaise Sorraia avec NMA de 3,83 (Luis *et al.*, 2006).

Le nombre d'allèle efficace varie de 1,79 à 6,46 chez le Barbe du Maroc et de 2,15 à 6,32 chez le Barbe Tunisien. Une telle différence entre cet indice et le NMA montre bien l'importance de la prise en compte de la répartition des fréquences des allèles dans l'étude de la diversité génétique (Rognon et Verrier, 2007). Ceci est particulièrement vrai pour le cas de la population marocaine qui présente à la fois le nombre total d'allèle le plus élevé et le nombre d'allèle efficace le plus faible.

Les taux d'hétérozygotie moyens attendus et observés étaient similaires à ceux calculés par Melliani (2007) qui avait fait une étude sur la caractérisation génétique du cheval Barbe au Maroc (0.740 +/- 0.1186 et 0.618 +/- 0.1228). Aussi, les résultats sont similaires, en comparaison avec d'autres travaux réalisés par Jordana *et al.*, (2000) chez des ânes Cataloniens, Perez-Gutierrez *et al.*, (2008) sur des chevaux Hispano-Bretons lourds. L'hétérozygotie attendue est supérieure à celle observée, malgré la richesse de la variabilité allélique, il y a un manque significatif d'hétérozygotes, due probablement au type de gestion de l'élevage (Perez-Gutierrez *et al.*, 2008).

Les taux d'hétérozygotie obtenus sont élevés et indiquent que les deux populations Barbes sont hétérogènes et présentent une grande variabilité génétique. Ceci est en corrélation avec le nombre d'allèles élevés, les fréquences alléliques et les résultats morpho-métriques et phénotypiques préalablement obtenus montrant une forte hétérogénéité des chevaux Barbes au Maroc et en Tunisie (Melliani, 2007). Cela va aussi dans le sens que l'effectif des chevaux Barbe a significativement augmenté durant ces dernières années grâce à l'inscription à titre initial des chevaux et donc la variabilité génétique tend aussi à augmenter au cours des générations.

Pour estimer la variabilité génétique entre le Barbe marocain et tunisien, l'indice de fixation génétique (Fst) a été estimé à 0,0454 et 0,0799 respectivement chez la population tunisienne et marocaine. Une étude réalisée sur les

chevaux de la Méditerranée occidentale a montré qu'il existe deux types de chevaux en Espagne: le type celtique au Nord et à l'Ouest, et le type espagnol, descendant du Barbe Africain dans le Sud et l'Est (Aparicio, 1960), ces chevaux ont également connu une baisse de l'effectif à cause de la mécanisation de l'agriculture. L'indice de fixation génétique chez cette population était de 0,0790, c'est une valeur très proche de celle du Barbe marocain.

L'étude réalisée sur les ânes Cataloniens ( $F_{st} = 0,0350$ ) a montré qu'ils ont connu une subdivision et donc une perte d'hétérozygotie (Jordana *et al.*, 2000). Les résultats obtenus dans cette étude indiquent au contraire que le cheval Barbe est fortement hétérozygote.

Le calcul du coefficient de différenciation génétique ( $G_{st}$ ) montre aussi que la différenciation entre les deux populations Barbes est presque nulle. Ce résultat est confirmé par l'obtention d'une distance génétique de Nei (1978) presque nulle (de 0,050) indiquant que ces populations sont pratiquement identiques.

Ces résultats ont une explication logique car non seulement les deux populations Barbes ont une même origine, mais aussi parce qu'elles ont subi les mêmes modifications morphologiques et aussi génétiques au fil des années selon les zones d'élevage, le Maroc et la Tunisie ayant presque les mêmes conditions climatiques (côtes, plaines, montagnes) et d'alimentation.

Les résultats obtenus par l'AFC montrent, l'existence de deux groupes de nuages de points distincts et la présence de quelques sujets qui se rejoignent au milieu des deux nuages. Ceci est expliqué par le fait que les deux populations de Barbe proviennent d'une aire géographique différente avec tout de même des individus qui peuvent appartenir à l'une des deux populations ou à l'autre. Dans une étude portant sur la phylogénétique de 120 individus repartis en 2 populations d'équidés, 6 populations asines et une population de zèbres selon 31 loci, l'AFC a donné 3 nuages distincts: le premier comprend les chevaux (*Equus caballus* et *ferus*) et les zèbres (*Hippotigris burchelli*), les deux autres nuages se départagent les différentes races asines (Kruger *et al.*, 2004). Là aussi, on voit l'importance de l'utilisation des marqueurs microsatellites pour avoir la situation précise de chaque individu au sein de sa population et la situation de chaque population par rapport à une autre.

L'application des méthodes proposées par Cornuet *et al.*, (1999) et Piry *et al.*, (2004) pour l'affectation des individus à leur population (tunisienne ou marocaine), a montré que 86,5% des individus sont bien classés. Au niveau de l'étude réalisée sur les 3 races de chevaux Danois, la race Frederiksborg et la race Jutland sont correctement assignés à une seule population. Par contre, la race Knabstrupper a été assignée à plus d'une population avec 14 mauvaises affectations pour 34 individus (seulement 41,2% de bonnes affectations) (Thirstrup *et al.*, 2008).

Dans cette étude, les fausses affectations sont probablement dues aux croisements entre les deux Barbes (proximité géographique, importation ou exportation des chevaux), aux ventes et achats possibles de chevaux Barbes entre la Tunisie et le Maroc, et aux possibles croisements que ces chevaux ont eu avec d'autres races spécialement le cheval Arabe.

## Relations génétiques entre le Barbe et d'autres races de chevaux

Le tableau des fréquences alléliques nous montre qu'il existe des allèles spécifiques à la race Barbe tels que les allèles 143, 145, 147, 149, 157 du microsatellite AHT4. La race qui possède le plus d'allèles en commun avec la race Barbe est l'Arabe-Barbe: l'allèle 101 du locus ASB17, l'allèle 99 du locus VHL20, les allèles 163 et 169 du locus HMS6...

La race Barbe a un nombre moyen d'allèle supérieur à l'Arabe et au Pur-sang Anglais et presque équivalent au NMA de la race Arabe-Barbe. Quant au taux d'hétérozygotie, l'Arabe-Barbe a la plus grande valeur, suivi du cheval Barbe. Les chevaux Pur-sang Arabe et Anglais ont les plus petites valeurs. Cela indique une grande variabilité génétique des chevaux Barbes et Arabe-Barbes et confirme les résultats des analyses biochimiques menées par Ouragh (1994).

Le calcul de l'indice de fixation génétique ( $F_{st}$ ) a montré que le cheval Pur-sang Anglais et le cheval Pur-sang Arabe sont les moins hétérozygotes, alors que le cheval Barbe marocain est le plus hétérozygote suivi de l'Arabe-barbe et du Barbe tunisien. Ceci confirme aussi les résultats obtenus par Ouragh (1994) par l'utilisation des marqueurs biochimiques.

Le coefficient de différenciation génétique ( $G_{st}$ ) a une valeur minimale entre les deux Barbes et entre le cheval Arabe et Arabe-Barbe, alors qu'il a sa valeur maximale entre le Pur-sang Anglais et le Barbe. Ces résultats sont bien représentés au niveau de l'AFC, la population Arabe-Barbe est en position intermédiaire entre le Barbe et l'Arabe, alors que le Pur-sang Anglais est le plus éloigné des populations Barbe.

Quant au calcul des similarités qui existent entre les 5 populations, il confirme que le groupe composé du cheval Barbe marocain et tunisien, et celui de l'Arabe et l'Arabe-Barbe sont les plus similaires. Les populations qui se ressemblent le moins sont en revanche le Pur-sang et le Barbe tunisien. Ceci est représenté plus clairement au niveau de l'arbre phylogénétique.

La population la plus consanguine est le Pur-sang Anglais et la population la moins consanguine est l'Arabe-Barbe du fait qu'elle est le fruit de plusieurs croisements entre le cheval Pur-sang Arabe, le cheval Barbe et Arabe-Barbe.

L'arbre phylogénétique a été réalisé à l'aide de deux méthodes: l'une est basée sur la distance génétique de Nei 1978 (UPGMA) et l'autre utilisant la distance de Cavalli-Sforza & Edwards 1967 (Neighbor-joining). Les deux distances ont leur valeur maximale entre le Pur-sang Anglais et le Barbe

Il existe un regroupement entre les Barbes de Tunisie et du Maroc d'un côté, et des 3 autres races de l'autre, qui est fortement soutenu par le Bootstrap (99,7%). Là encore Mériaux *et al.*, (2000) avaient démontré, suite à une étude réalisée sur les 9 races de chevaux, que le cheval Arabe est en position intermédiaire, ce qui prouve son utilisation dans le passé pour l'amélioration de plusieurs populations équines. Dans une étude réalisée par Dovic *et al.*, (2004)



sur le cheval Lippizan, l'arbre obtenu contenait un groupe formé par le Caspian Poney, l'Arabe, l'Akhal-Teké et le Lippizan. Les 3 premières races font parties des chevaux de type oriental. Ce regroupement est donc basé sur leur origine provenant des steppes du Moyen-Orient et d'Asie. La présence du Lippizan dans ce groupe peut être expliquée par l'influence du cheval Arabe pendant la formation de cette race (Dovc *et al.*, 2004).

Cependant, la position du Pur-sang Anglais par rapport au Barbe est en contradiction avec la théorie qui dit que la race Pur-sang Anglais provient aussi du Barbe.

## CONCLUSION

Les résultats obtenus dans la présente étude peuvent être utilisés pour conseiller la gestion de cette ancienne race d'Afrique du Nord afin de la sauvegarder. L'utilisation des marqueurs microsatellites a permis d'obtenir des résultats plus précis et plus avancés. Ils permettent de détecter les populations qui sont menacées d'extinction à cause de la perte progressive de la variation génétique et informent les sélectionneurs sur les relations entre les races permettant ainsi une meilleure gestion de la reproduction. Les informations obtenues pour chaque race peuvent être utilisées pour la création d'un programme qui gère les croisements pour éviter la consanguinité et la perte d'hétérozygotie.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aparicio G. (1960). Zootecnia Especial. Imprenta Moderna. Cordoba, Spain.
- Aurregio E. (1915). Chevaux et animaux du nord de l'Afrique. Extrait des bulletins et mémoires de la société des sciences vétérinaires de Lyon.
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N., Bonhomme F. (2004). GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations (1996-2004) Montpellier (France): Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II.
- Cavalli-Sforza L.L., Edwards A.W.F. (1967). Phylogenetic analysis: models and estimation procedure. *Evolution*, 21: 550-570.
- Cornuet J.M., Piry S., Luikart G., Estoup A., Solignac M. (1999). New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics*, 153: 1989-2000.
- Dovc P., Susnik S., Snoj A. (2004). Experience from Lippizan horse and salmonid species endemic to the Adriatic river system. Examples for the application of molecular markers for preservation of biodiversity and management of animal genetic resources. *Journal of Biotechnology*. 113 : 43-53.
- Gaudois M. (1987). Le cheval Barbe et ses croisements. In: Tous les textes officiels sur le cheval Barbe. Editions caracole, Lausanne, pp 85-10.
- Hubisz M., Falush D., Stephens M., Pritchard J. (2009). STRUCTURE 2.3.X, logiciel pour étudier la structure de la population (2000-2009). Le laboratoire de Pritchard, université de Chicago, service des sciences biologiques.
- Jordana J., Folch P., Aranguren J.A. (2000). Microsatellite analysis of genetic diversity in the Catalonian donkey breed. *J. Anim. Breed. Genet.*, 118: 57-63.
- Kruger K., Gaillard C., Stranzinger G., Rieder S. (2004). Phylogenetic analysis and species allocation of individual equids using microsatellite data. *J. Anim. Breed. Genet.*, 122: 78-86.
- Lagella Olivier (1999). population software available at <http://bioinformatics.org/populations/>
- Lassère J. M. (1991). «Barbe», in Gabriel Camps, *Baal - Ben Yasla*, Aix-en-Provence, Edisud («Volumes», n°9), mis en ligne le 01 décembre 2012. URL: <http://encyclopedieberbere.revues.org/1292>
- Luis C., Juras R., Oom M.M., Cothran E.G. (2006): Genetic diversity and relationships of Portuguese and other horse breeds based on protein and microsatellite loci variation. International Society for Animal Genetics, *Animal Genetics*, 38: 20-27.
- Marletta D., Tupac-Yupanqui I., Bordonaro S., Garcia D., Guastella A.M., Criscion A., Canon J., Dunner S. (2006): Analysis of genetic diversity and the determination of relationships among western Mediterranean horse breeds using microsatellite markers. Journal compilation, Blackwell Verlag, Berlin. *J. Anim. Breed. Genet.*, 123: 315-325.
- Melliani S. (2007). Contribution à la caractérisation morphométrique, phénotipique et génétique du cheval Barbe au Maroc. *Thèse Doc. Méd. Vét.* IAV Hassan II. Rabat. p 71-78.
- Mériaux J.-C., Rognon X., Laloë D., (2000). Genetic diversity within and among nine French horse breeds. XXVII<sup>th</sup> International Congress on Animal Genetics, Minnesota, USA, July 20-25, 2000
- Nei M., (1978): *Molecular evolutionary genetics*. Colombia University Press, New York.
- Nei M. (1978). estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590.
- Nei M., Chesser R. K. (1983). Estimation of fixation indices and diversities. *Ann. Hum. Genet.*, 47: 253-259.
- Ouragh L., Mériaux J.-C., Braun J.-P., (1994). Genetic blood markers in Arabian, Barb and Arab-Barb horses in Morocco. *Animal genetics*, 25: 45-47
- Page R. (2001). Treeview version 1.6.6, <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod.treeview.html>
- Perez-Gutierrez L.M., De la Pena A., Arana P. (2008). Genetic analysis of the Hispano-Breton heavy horse. International Society for Animal Genetics, *Animal Genetics*, 39:506-514.
- Piry S., Alapetite A., Cornuet J.-M., Paetkau D., Baudouin L., Estoup A., (2004). GeneClass2: a software for genetic assignment and first génération migrants détection. *Journal of Heredity*, 95:536-539.
- Rognon X., Verrier E., (2007). Caractérisation et gestion des ressources génétiques : Les outils et méthodes de la génétique pour la caractérisation, le suivi et la gestion de la variabilité génétique des populations animales. AUF-Rabat, 12-15 mars 2007.
- Saitou N., Nei M., (1987). The Neighbor-joining Method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.
- Sneath P.H.A., Sokal R.R., (1973). Numerical taxonomy. Freeman WH & Co, San Francisco, 573 pp
- Thirstrup J.P., Pertoldi C., Loeschcke V. (2008): Genetic analysis, breed assignment and conservation priorities of three native Danish horse breeds. International Society for Animal Genetics, *Animal Genetics*, 39: 496-505.