

Diversité génétique observée sur quelques races porcines européennes

G. LAVAL (1), Nathalie IANNUCELLI (1), C. LEGAULT (2), D. MILAN (1)
J. L. FOULLEY (2), C. CHEVALET (1), L. OLLIVIER (2)

Institut National de la Recherche Agronomique,
(1) Laboratoire de Génétique Cellulaire - BP 27, 31326 Castanet-Tolosan Cedex
(2) Station de Génétique Quantitative et Appliquée - 78352 Jouy-en-Josas Cedex

Diversité génétique observée sur quelques races porcines européennes

Un ensemble de onze races porcines en provenance de six pays européens, et incluant un petit échantillon de sangliers, a été choisi pour une étude de diversité génétique. Cette diversité a été évaluée sur la base de 18 marqueurs microsatellites typés sur un total de 467 échantillons d'ADN. Les races étudiées manifestent un taux d'hétérozygotie allant de 0,35 à 0,60. Les locus sont en équilibre de Hardy-Weinberg à l'exception du cas des races allemandes *Landrace* et *Schwäbisch-Hällisches*, qui manifestent un déficit d'hétérozygotes. L'indice de différenciation entre races est élevé, avec un F_{ST} global de 0,27. Les distances génétiques entre races ont d'abord été utilisées pour construire des arbres phylogénétiques, mais aucune phylogénie fiable n'a pu être établie entre les races. Les mêmes distances ont ensuite été utilisées pour mesurer la diversité génétique globale de l'ensemble et évaluer la perte marginale de diversité associée à chacune des races étudiées. De ce point de vue, la race française Basque apparaît comme la plus originale dans l'ensemble considéré. Cette étude, qui reste à étendre à un plus grand nombre de races européennes, indique que l'utilisation des distances entre races animales domestiques dans une approche taxonomique classique risque d'avoir un faible pouvoir de résolution, mais souligne l'intérêt de les utiliser plutôt pour des évaluations prospectives de diversité.

Genetic diversity among some European pig breeds

A set of eleven pig breeds originating from six European countries, and including a small sample of wild pigs, was chosen for this study of genetic diversity. Diversity was evaluated on the basis of 18 microsatellite markers typed over a total of 467 individuals. Average breed heterozygosity varied from 0.35 to 0.60. Genotypic frequencies generally agreed with Hardy-Weinberg expectations, apart from the German *Landrace* and *Schwäbisch-Hällisches* breeds, which showed significantly reduced heterozygosity. Breed differentiation was significant as shown by the high among-breed fixation index (overall $F_{ST}=0.27$). The genetic distances between breeds were first used to construct phylogenetic trees, but no reliable phylogeny could be inferred. The same distances were also used to measure the global diversity of the set of breeds considered, and to evaluate the marginal loss of diversity attached to each breed. In that respect, the French Basque breed appeared to be the most "unique" in the set considered. This study, which remains to be extended to a larger set of European breeds, indicates that using genetic distances between breeds of farm animals in a classical taxonomic approach may not give clear resolution, but points to their usefulness in a prospective evaluation of diversity.

INTRODUCTION

L'Europe contient une grande part de la variabilité génétique porcine, si on se base sur le nombre des races européennes inventoriées, qui représente 37 % de l'inventaire mondial de la FAO selon SCHERF (1995). Cependant, la production porcine européenne repose en grande partie sur un nombre assez limité de races, puisqu'une seule race, le Large White, représente environ le tiers des gènes contenus dans les porcs abattus de l'Union Européenne. L'Europe peut donc avoir besoin de sources nouvelles de variabilité génétique pour améliorer les lignées commerciales, comme le montre l'exemple de la race chinoise Meishan aujourd'hui incluse dans plusieurs lignées composites, ou pour s'adapter à de nouvelles demandes du consommateur.

Des programmes de conservation sont déjà engagés dans plusieurs pays européens, avec notamment la création de cryobanques (LABROUE et al, 2000). Dans ce contexte, le besoin d'évaluer avec précision la biodiversité de l'espèce se fait sentir, afin de rationaliser les politiques de conservation (voir par exemple WEITZMAN, 1993). Chez le porc, des outils de génétique moléculaire sont maintenant disponibles, suite notamment au projet européen PiGMaP (OLLIVIER et al, 1995). Dans la seconde phase de ce projet (1994-1996), une étude-pilote de diversité avait été lancée (voir ARCHIBALD, 1997), en suivant les recommandations faites en 1993 par un groupe de travail FAO (BARKER et al, 1998). Nous nous proposons de présenter ici les principaux résultats de cette étude et les conclusions à en tirer pour la poursuite de telles recherches. Une présentation plus détaillée paraîtra dans la revue *Genetics Selection Evolution* (LAVAL et al, 2000).

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1. Les races échantillonnées

Cette étude porte sur 11 races européennes originaires de 6 pays différents (tableau 1). L'objectif fixé était d'échantillonner un maximum de 50 animaux par race tout en minimisant les relations de parenté entre individus. Le tableau 1 montre que cet objectif a été atteint, ou approché, pour 8 de ces races. Pour les races présentant un effectif important, le protocole visait à sélectionner 25 mâles et 25 femelles non apparentés (au moins jusqu'au niveau des grands-parents). Ceci étant impossible pour les races de faible effectif, 1 mâle et 1 femelle ont été retenus dans 25 portées toutes de mères différentes et représentant le plus grand nombre possible de pères.

1.2. Les marqueurs et les typages

Une liste des 27 marqueurs microsatellites a été constituée suivant les recommandations de la FAO (BARKER et al, 1998). Chaque marqueur a été choisi pour son polymorphisme ainsi que pour l'absence constatée d'allèles nuls. Les marqueurs retenus sont répartis sur l'ensemble du génome (à part le chromosome 18) et séparés d'au moins 30 centimorgans quand ils sont situés sur le même chromosome (LAVAL

et al, 2000). Les typages ont été réalisés par les laboratoires de Toulouse (les 4 races françaises et la race belge BEPI), de Wageningen (NLLW), de Uppsala (SELR, SEWP), de Copenhague (DKSO) et de Stuttgart-Hohenheim (DESH et DELR). Ces laboratoires ont tous utilisé des amorces synthétisées par le professeur Rothschild (Ames, Iowa) pour déclencher la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) correspondant à chaque microsatellite. Malgré le protocole de standardisation appliqué par ces 5 laboratoires différents, il n'a pas toujours été possible d'attribuer sans ambiguïté à chaque animal un génotype pour chaque locus. Cela a conduit à un nombre de génotypes effectifs variable d'un locus à l'autre (tableau 1). Dans certains cas aucun génotype n'a pu être identifié (marqueur CGA dans la plupart des races et 7 marqueurs dans les deux races allemandes DELR et DESH). Au total, les résultats analysés se réduisent à 467 échantillons typés pour 18 microsatellites répartis sur 15 chromosomes (les chromosomes 11, 15, 16, en plus du chromosome 18, n'étant pas marqués)

1.3. L'analyse génétique

L'équilibre de Hardy-Weinberg à chaque locus dans chaque race a été testé selon la méthode et le logiciel décrits par RAYMOND et ROUSSET (1995).

La différenciation entre races a été évaluée par les indices de fixation de WRIGHT, calculés selon WEIR et COCKERHAM (1984). Les **distances génétiques** entre les races deux à deux ont été calculées selon l'approche classique basée sur les fréquences alléliques dans chaque race (HARTL et CLARK, 1997), en retenant la distance de REYNOLDS (1983) et la distance standard de NEI (1972).

Ces distances ont d'abord été utilisées pour construire des **arbres phylogénétiques**, basés sur l'hypothèse que la distance génétique qui sépare deux races est proportionnelle au temps qu'elles ont mis à diverger à partir d'une race-ancêtre. La première méthode retenue est celle de la jonction des voisins (référéncée dans HARTL et CLARK, 1997,) et le degré de confiance à accorder aux embranchements mis en évidence a été évalué selon une procédure de ré-échantillonnage, dite de la " languette de botte " (FELSENSTEIN, 1993). Une autre méthode de construction d'arbre retenue est celle préconisée par WEITZMAN (1993).

Les distances entre races ont ensuite été utilisées pour mesurer la **diversité globale** de l'ensemble des races considérées, selon la méthode de WEITZMAN (1993).

2. RÉSULTATS

Les résultats des analyses intra-race sont présentés au tableau 1. Les niveaux d'hétérozygotie sont compris entre 0,35 et 0,60, et voisins de ceux révélés par des études portant sur d'autres espèces animales.

La grande majorité des combinaisons locus/race, soit 179/187 (17 locus autosomiques pour 11 races), ne montre aucun écart significatif à la loi de Hardy-Weinberg (union au hasard des gamètes : panmixie). Seules les deux races allemandes DESH et DELR montrent un déficit significatif

Tableau 1 - Effectifs par race et polymorphisme intra-race

Race	Code	Nombre d'échantillons d'ADN	Nombre de génotypes par locus (min et max)	Hétérozygotie observée	Nombre d'allèles observés	Test de Hardy-Weinberg (1)	N _e (2)
Piétrain	BEPI	50	40-46	0,60	5,33	NS	32686
Sortbroget (porc local danois)	DKSO	59	47-50	0,53	5,17	NS	44
Basque	FRBA	47	40-46	0,35	3,22	NS	13
Gascon	FRGA	56	18-56	0,47	4,05	NS	28
Limousin	FRLI	56	41-56	0,43	3,70	NS	13
Normand	FRNO	52	33-52	0,50	4,28	NS	33
Landrace allemand	DELIR	50	38-50	0,54	5,61	*(0,15)	1837
Schwäbisch-Hällisches (porc souabe)	DESH	45	41-45	0,53	5,72	*(0,20)	128
Grand Yorkshire (Large White)	NLLW	32	28-30	0,51	4,11	NS	7368
Landrace suédois	SELR	24	20-24	0,57	4,78	NS	-
Sanglier européen	SEWP	12	9-12	0,58	4,55	NS	-

(1) NS: non significatif ; *: $P < 0,05$ et valeurs de l'indice de fixation intra-race (F_{IS} de WEIR et COCKERHAM, 1984)

(2) N_e: effectif génétique donné par SIMON et BUCHENAUER (1993)

Tableau 2 - Indices de fixation par locus (WEIR et COCKERHAM, 1984): intra-race (F_{IS}), intra-ensemble de races (F_{IT}) et entre races (F_{ST})

Chromosome	Locus	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
1	S0155	0,04	0,28	0,25
2	SW240	0,03	0,19	0,17
2	S0226	0,11	0,37	0,30
3	S0002	0,01	0,25	0,24
4	S0227	0,24	0,33	0,12
5	S0005	-0,01	0,19	0,19
5	IGF1	-0,02	0,17	0,18
6	SW122	-0,00	0,14	0,14
7	SW632	0,12	0,36	0,28
8	S0225	0,15	0,46	0,37
8	S0178	0,02	0,15	0,13
9	SW911	0,07	0,36	0,31
10	SW951	0,13	0,41	0,32
12	S0090	0,02	0,38	0,36
13	S0215	0,22	0,79	0,74
14	SW857	0,07	0,33	0,28
17	SW24	0,06	0,37	0,33
X	S0218	0,09	0,31	0,24
TOTAL		0,05	0,31	0,27

d'hétérozygotes, puisque les 8 écarts significatifs sont tous observés dans ces deux races. Cela suggère la possibilité d'un mode de reproduction où les croisements entre individus apparentés seraient favorisés (homogamie, consanguinité). Notons qu'un déficit d'hétérozygotes peut aussi être imputé au type de marqueurs utilisé ici, puisque des " ratés " de la réaction PCR peuvent parfois conduire à la non-détection de certains allèles. On parle d'" allèle nul ", et les individus porteurs d'un allèle de ce type se trouvent alors abusivement classés comme homozygotes.

Les indices F_{ST} du tableau 2 montrent une forte individualisation de ces races de porcs, avec un indice moyen de 0,27.

Dans l'échelle de WRIGHT cette valeur correspond à la catégorie supérieure de **très grande différenciation**, dont la limite est fixée à 0,25 (HARTL et CLARK, 1997).

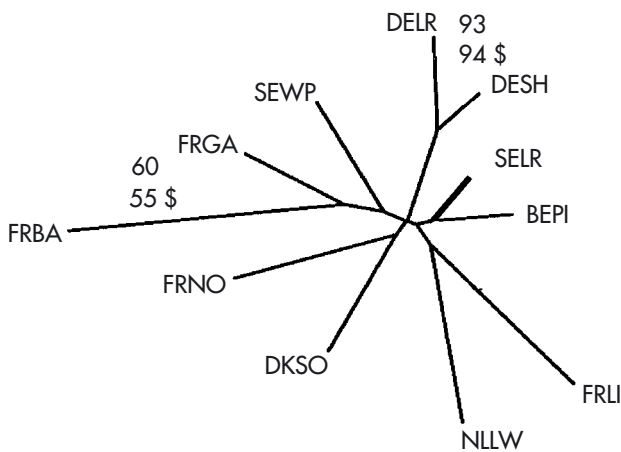
Il existe une grande similitude entre les résultats obtenus avec les différentes distances génétiques. Le tableau 3 le montre pour deux de ces distances, malgré la différence d'échelle. On voit que dans les deux cas c'est le porc basque qui est le plus éloigné de l'ensemble des autres races (voir les distances FRBA-FRLI, FRBA-DELIR et FRBA-DESH indiquées en gras au tableau 3), et que la plus petite valeur est obtenue pour le couple Piétrain-Landrace Suédois (voir les distances BEPI-SELR indiquées en italiques au tableau 3, p.400).

Tableau 3 - Distances génétiques entre les onze races (18 locus marqueurs). Distance de Reynolds (au-dessus de la diagonale) et distance standard de Nei (au-dessous de la diagonale)
(Les deux plus grandes distances sont en caractères gras et les deux plus faibles en italiques)
(Voir tableau 1 pour le code des races)

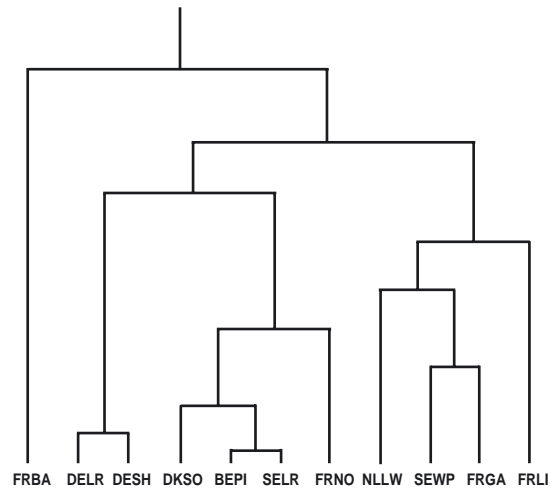
	BEPI	DKSO	FRBA	FRGA	FRLI	FRNO	DELR	DESH	NLLW	SELR	SEWP
BEPI		0,2155	0,3046	0,1532	0,2464	0,2133	0,2389	0,2014	0,2128	<i>0,1024</i>	0,1856
DKSO	0,4349		0,3775	0,2794	0,2534	0,2275	0,2641	0,2321	0,2984	0,1703	0,2363
FRBA	0,4525	0,6772		0,2725	0,4358	0,3397	0,4229	0,3589	0,3990	0,2918	0,3010
FRGA	0,2344	0,5669	0,3205		0,2963	0,2714	0,2961	0,2382	0,2711	0,1970	0,2209
FRLI	0,3807	0,3810	0,6696	0,4489		0,3126	0,3414	0,2886	0,2862	0,2371	0,2740
FRNO	0,3564	0,3760	0,4536	0,4498	0,4698		0,3082	0,2553	0,3138	0,1808	0,2210
DELR	0,6116	0,6920	1,1223	0,7532	0,7949	0,7658		<i>0,1172</i>	0,3107	0,2381	0,2860
DESH	0,5088	0,6085	0,7943	0,5490	0,6113	0,5825	0,2607		0,2799	0,2000	0,2090
NLLW	0,3416	0,5806	0,6151	0,4328	0,3877	0,5346	0,7444	0,6677		0,1994	0,3150
SELR	<i>0,1634</i>	0,3003	0,4101	0,3289	0,3513	0,2740	0,5935	0,4907	0,3043		0,1913
SEWP	0,3770	0,5236	0,4546	0,4109	0,4708	0,3871	0,9168	0,5632	0,7106	0,3864	

Figure 1 - Arbres phylogénétiques des onze races étudiées

1a - Méthode de la jonction des voisins, avec degrés de confiance (en %) basés sur les distances de Reynolds et les distances standard de NEI (\$) du tableau 2



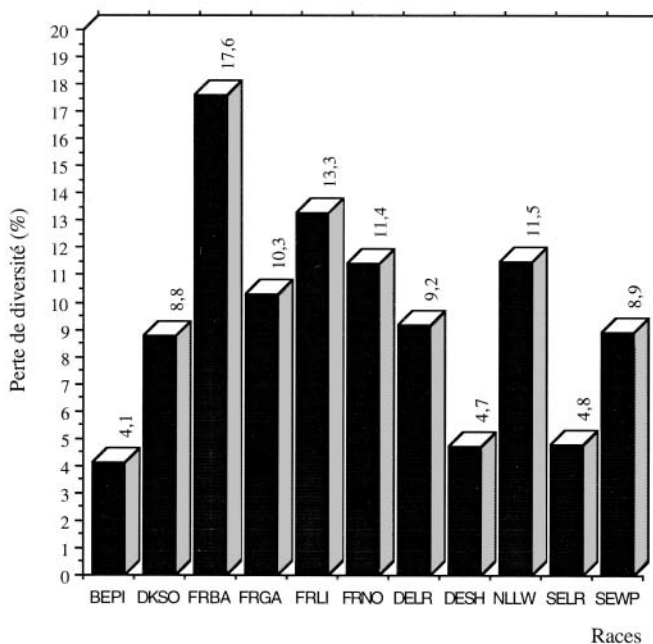
1b - Méthode de WEITZMAN (1993) utilisant les distances de Reynolds



Il existe aussi une forte similitude entre les arbres construits à partir des différentes distances. Le degré de fiabilité à accorder à ces topologies est également très faible dans tous les cas. Seul le nœud connectant les populations allemandes DESH et DELR approche le seuil de signification de 95 % donné par FELSENSTEIN (1985) (présence de ce nœud dans 95 % des arbres construits après ré-échantillonnage). Cela signifie que les arbres distinguent au mieux deux ensembles qui auraient pu dériver d'un noyau commun : les deux races allemandes contre l'ensemble des autres races européennes, à l'intérieur duquel il est impossible de dire comment les races pourraient avoir dérivé les unes des autres (voir figure 1a)

La méthode de WEITZMAN (WEITZMAN, 1993 ; THAON D'ARNOLDI et al, 1998) permet aussi de construire des phylogénies (voir figure 1b). Les arbres ainsi obtenus ont la particularité de présenter des longueurs de branche qui, pour chaque race, correspondent à la diversité qui serait perdue si elle disparaissait. Les figures 1b et 2 montrent l'inégalité de la contribution de chacune des 11 races étudiées à la diversité globale. Cette contribution varie en effet de 4,1 % pour le Piétrain à 17,6 % pour le porc basque, sur la base des distances de Reynolds (figure 2). Le caractère à part du porc basque est confirmé par la figure 1b qui suggère en outre une proximité entre les "Landrace" allant de DELR à FRNO. Par ailleurs, comme indiqué dans LAVAL et al,

Figure 2 - Pertes marginales de diversité liées à la disparition de chacune des onze races, calculées à partir des distances de Reynolds



(2000), l'ensemble des 4 races françaises contribue pour 50 % à la diversité totale des 11 races considérées.

CONCLUSIONS

Cette étude-pilote est peut-être la première démonstration de faisabilité d'une évaluation de diversité génétique entre races couvrant plusieurs pays et conduite selon les recommandations faite par la FAO en 1993. Une fois l'accord obtenu sur un ensemble de marqueurs communs, les règles essentielles à observer pour arriver à comparer les allèles entre différents laboratoires sont (i) d'inclure *sur le même gel* un ensemble d'échantillons d'ADN témoins distribués au préalable aux participants, et (ii) d'utiliser de préférence des *amorces synthétisées en une seule fois dans un même laboratoire*, comme cela a été fait dans cette expérience.

Les marqueurs choisis pour cette étude manifestent un degré élevé de polymorphisme, et de plus les onze races étudiées révèlent une très forte différenciation. Malgré cela, il semble difficile de conclure à une phylogénie fiable entre ces populations. Cette situation s'explique probablement par le fait que nos races domestiques actuelles ne sont pas le résultat de processus évolutifs comparables à ceux des espèces, du fait de nombreux échanges entre races (voir THAON D'ARNOLDI et al, 1998). Mais il existe par ailleurs un besoin de mesure de la diversité d'un ensemble de races, en vue d'éva-

luations prospectives de cette diversité, sur lesquelles des politiques de conservation puissent être basées, comme l'a montré par exemple WEITZMAN (1993). Cette approche repose sur des mesures de distances génétiques telles que celles utilisées ici. Nos résultats montrent l'intérêt d'évaluer globalement la diversité à l'aide des marqueurs moléculaires de cette étude pour choisir les races méritant d'être préservées. Mais, comme le soulignent BARKER et al (1998), les décisions de conservation doivent aussi prendre en compte d'autres informations relatives à des caractères économiquement importants et à des caractéristiques d'adaptation.

Soulignons en conclusion que les quatre races locales françaises, qui représentent moins de 1 p. mille du cheptel truies de notre pays, contribuent à expliquer plus de la moitié de la diversité génétique totale d'un ensemble de races qui, bien que limité en nombre, inclut quand même trois des races les plus utilisées dans l'Union Européenne, Large White, Landrace et Piétrain. Cela indique la valeur potentielle de certaines races locales, menacées de disparition, dans le maintien de la diversité génétique d'une espèce.

REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié du soutien du programme biotechnologie de la CE (contrat PiGMaP BIO2-CT94-3044 et contrat BIO4-CT98-0188), ainsi que d'un financement complémentaire du Ministère de l'Agriculture, que nous remercions très sincèrement.

Les échantillons Piétrain ont été préparés par A. VAN DE WEGHE et L. PEELMAN (Gand, Belgique). L'échantillonnage et la préparation de l'ADN des races françaises est dû aux efforts conjoints de D. BRAULT, G. BURGAUD, J.C. CARITEZ et J. GRUAND (INRA) et de M. LUQUET et Florence LABROUE (ITP). L'échantillonnage et le typage des ADN des races allemandes, danoise, hollandaise et suédoise ont été réalisés respectivement par H. GELDERMANN (Stuttgart, Allemagne), M. FREDHOLM (Copenhague, Danemark), M. GROENEN (Wageningen, Pays-Bas) et L. ANDERSSON (Uppsala, Suède). Ce dernier a également fourni les résultats du Sanglier. Qu'ils soient tous remerciés ici.

Nous remercions aussi le Prof. M. F. ROTHSCHILD (Ames, Iowa, USA), coordonnateur du projet génome porcin des États-Unis, d'avoir gracieusement fourni les amorces de typage aux 5 laboratoires participants.

Nos remerciements vont enfin à Marie-Laure LE PAIH (INRA/SGQA, Jouy-en-Josas) pour son aide à la réalisation de ce texte.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ARCHIBALD A., 1997. The pig gene mapping project (PiGMaP) – Identifying trait genes. In: Hoeveler A., Cresti M. (Eds.), Biotechnology (1992-1994) Final Report, Vol II. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 193-207.
- BARKER J.S.F., HILL W.G., BRADLEY D. et al, 1998. Measurement of domestic animal diversity (MoDAD): original working group report. FAO, Rome, 55 p.
- FELSENSTEIN J., 1985. Evolution, 39, 783-791.

- FELSENSTEIN J., 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- HARTL D.L., CLARK A.G., 1997. Principles of Population Genetics. 3rd ed., Sinauer, Sunderland, Massachusetts, 542 p.
- LABROUE F., GUILLOUET P., BUSSIÈRE J., LUQUET M., OLLIVIER L., 2000. Journées Rech. Porcine en France, 32, 413-418.
- LAVAL G., IANNUCELLI N., LEGAULT C. et al, 2000. Genet. Sel. Evol. (soumis pour publication).
- NEI M., 1972. Am. Nat., 106, 283-292.
- OLLIVIER L., GELLIN J., MILAN D. et al, 1995. Journées Rech. Porcine en France, 27, 127-134.
- RAYMOND M., ROUSSET F., 1995. J. Heredity, 86, 248-249
- REYNOLDS J., 1983. Genetics, 105, 767-779.
- SCHERF B., 1995. World Watch List for Domestic Animal Diversity. 2nd ed., FAO, Rome.
- SIMON D.L., BUCHENAUER D., 1993. Genetic Diversity of European Livestock Breeds. EAAP Publication no 66, Wageningen Pers, Wageningen, 581 p.
- THAON D'ARNOLDI C., FOULLEY J.L., OLLIVIER L., 1998. Genet. Sel. Evol., 30, 149-161.
- WEIR B.S., COCKERHAM C.C., 1984. Evolution, 38, 1358-1370.
- WEITZMAN M.L., 1993. Quart. J. Econ., 108, 157-183.