

Première expérience d'utilisation de semence de la Cryobanque Nationale comme outil de gestion de la variabilité génétique en race locale porcine

Marie-José MERCAT (1), Herveline LENOIR (1), Stéphane FERCHAUD (2), Philippe GUILLOUET (2)

(1) IFIP-Institut du porc, La Motte au Vicomte, BP 35104, 35651 Le Rheu Cedex

(2) INRA, Unité Expérimentale d'Insémination Caprine et Porcine (U.E.I.C.P.), 86480 Rouillé

Avec la collaboration technique de Christian Audoux (2), Yoann Bailly (2), Jany Boutin (2) et Sylvain Michel (2) ainsi que des éleveurs de races locales.

marie-jose.mercat@ifip.asso.fr

Première expérience d'utilisation de la semence de la Cryobanque Nationale comme outil de gestion de la variabilité génétique en race locale porcine

Le maintien de la variabilité génétique des races locales porcines repose sur une gestion rigoureuse des accouplements. Le stock de semences conservées dans la Cryobanque Nationale constitue une sauvegarde du patrimoine destiné à permettre la reconstitution d'une race en cas d'extinction. L'expérience concerne l'utilisation des stocks de la Cryobanque Nationale pour gérer la variabilité en élevage, montrant ainsi la complémentarité des outils de conservation *in situ* et *ex situ*. Quatre truies Porc Blanc de l'Ouest (PBO) et 7 truies Bayeux ont été regroupées sur un site pour être inséminées avec de la semence conservée dans la cryobanque. Les reproducteurs ont été choisis sur des critères de parenté de façon à recréer des animaux faiblement apparentés avec la population active. Les quatre truies PBO ont mis bas 28 porcelets dont 14 mâles. Quatre verrats et neuf cochettes nés à partir de semence congelée sont partis en élevages pour la reproduction et deux verrats sont entrés en CIA pour compléter les stocks de semence de la cryobanque. En revanche, en race Bayeux, une seule truie sur sept a mis bas. Pour cette race, les mauvais résultats de reproduction peuvent être attribués à la parité (multipares) des truies et à leur comportement après regroupement, à leur consanguinité élevée ainsi qu'à des problèmes sanitaires. La semence congelée peut donc être utilisée pour gérer la variabilité génétique dans le cadre de la conservation de races sous réserve de maîtrise des conditions d'élevage.

First experience of use of semen from the national cryobank as a management tool of genetic diversity in local pig breeds

Preservation of genetic variability of local pig breeds lies on a rigorous management of matings. Semen stocks preserved in the national cryobank constitute a patrimonial safeguard intended to reconstitute breeds in case of extinction. The goal of the present experience is to use frozen semen of the national cryobank to manage genetic diversity in farms, thus showing the complementarities of *in situ* maintaining of local breeds and *ex situ* cryopreservation. Sows of Porc Blanc de l'Ouest (PBO) and Bayeux breeds have been herded together to be inseminated with semen from the cryobank. Animals have been chosen according to the coefficients of coancestry in order to give birth to animals lowly related to the active population. Four PBO sows farrowed 28 piglets of which 14 males. Four boars and 9 gilts born from frozen semen have been kept for reproduction on farms and 2 boars entered an AI centre to complete the national cryobank. On the other hand, only one Bayeux out of 7 farrowed. This poor performance can be linked to parity (multiparous) and sow's behaviour in group, to inbreeding of sows and to sanitary problems. As far as breeding conditions are well controlled, frozen semen can be used to manage genetic variability of breeds in conservation.

INTRODUCTION

Depuis 1981, les races locales porcines françaises font l'objet d'un programme de conservation dont l'un des objectifs est le maintien de la variabilité génétique par une gestion rigoureuse des accouplements. Dans ce but, le recours à de la semence congelée peut s'avérer utile. C'est pourquoi une cryobanque a été mise en place dès 1982, puis complétée entre 1996 et 2001 grâce à un projet européen (Labroue et al., 2000b). Les doses de semence sont aujourd'hui conservées dans la Cryobanque Nationale dont la mission est de préserver les ressources génétiques des animaux d'élevage à long terme. L'utilisation du matériel cryoconservé est soumise à l'accord de la Cryobanque Nationale, du LIGERAL (Association des Livres Généalogiques Collectifs des Races Locales de Porcs) et de l'IFIP conformément à la convention qui les lie.

Malgré l'efficacité du programme de conservation, l'analyse de la variabilité génétique des races locales porcines montre des niveaux de consanguinité moyenne élevés (Maignel et Labroue, 2001) et ce, tout particulièrement en race Bayeux. Dans cette race, la consanguinité moyenne était en 2005 de 20,3 % contre 8,1 % en Porc Blanc de l'Ouest (source IFIP).

L'objectif de la présente expérience était de produire des reproducteurs Bayeux et Porc Blanc de l'Ouest (PBO) faiblement apparentés avec le reste de leurs populations respectives grâce à l'utilisation de semence décongelée. Le choix des reproducteurs a reposé, en grande partie, sur les calculs de coefficients de parenté. Pour la race Bayeux, une des motivations était également d'obtenir des animaux de type Longué (poitrine plus profonde et oreilles tombantes). Le programme de décongélation a été suivi d'une campagne de congélation de la semence de verrats nés eux-mêmes à partir de semence congelée.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1. Inséminations avec des doses de semence décongelée

1.1.1. Choix des verrats

Lors de la mise en place du programme de conservation, les populations de races locales porcines ont été divisées en groupes de reproduction baptisés « lignées » pour les mâles et « familles » pour les femelles.

Pour chacune des deux races, deux verrats ont été sélectionnés : en PBO, les verrats 418 et 153 nés en 1989 (semence congelée en 1990/1991 avec la méthode de congélation en pellets décrite par Paquignon et al. 1986) ; en Bayeux, les verrats 006 et 049 nés respectivement en 1988 et 2000 (pour le verrat 006, semence congelée en 1989, également en pellets ; pour le verrat 049, semence congelée en 2001 en paillettes selon la méthode décrite par Thilmant, 1997). Le choix des verrats a été fonction : 1) de la lignée (lignées éteintes), 2) des souhaits de l'association Bayeux-Longué (morphologie des verrats), 3) de l'apparentement entre les verrats et la population de femelles actives (coefficient de parenté moyen calculé selon la méthode de Meuwissen et Luo, 1992), 4) du génotype au locus RYR1 / Halothane (les verrats utilisés sont hétérozygotes Nn).

1.1.2. Choix des truies

Les truies ont été choisies en fonction : 1) de leurs coefficients de parenté avec les verrats retenus, 2) de leur génotype au locus RYR1 / Halothane, 3) du nombre de femelles actives par famille, et 4) du stade physiologique des truies aux périodes d'insémination planifiées.

Quatre truies PBO et 7 truies Bayeux (4 dans un premier temps, puis 3 autres truies dans un second temps) ont été retenues pour être inséminées. Elles ont été transférées dans une porcherie à l'U.E.I.C.P. (Rouillé) et logées en groupe (loge de grande taille), l'accès à l'auge se faisant par des cases à bas flancs, ouvertes sur l'arrière. Des sérologies Aujeszky, PPC, Brucellose et SDRP ont été réalisées à l'élevage d'origine (dans le mois précédant le transfert) puis à l'arrivée à l'U.E.I.C.P., conformément au programme sanitaire suivi par les verrats présents sur le centre d'insémination artificielle.

1.1.3. Inséminations en semence décongelée

Pour la décongélation, les doses de semence congelée en pellets (200 pastilles dans un visotube de 20 ml, soit environ 9 milliards de spermatozoïdes) sont versées dans 100 ml de dilueur BTS à 50 °C et utilisées dans l'heure. La qualité des semences décongelées est évaluée au microscope (pourcentage de spermatozoïdes mobiles et note de mobilité selon l'échelle de Bishop et al., 1954) à 10 minutes et 120 minutes post décongélation (l'utilisation d'un analyseur d'images pose des problèmes techniques en raison de la viscosité et de la présence de granules de jaune d'œuf des pellets). La décongélation des doses en paillettes se fait en deux temps. Les paillettes sortant de l'azote liquide sont plongées dans un bain-marie à 55°C pendant 12 secondes, puis à l'aide d'une tige poussoir, elles sont vidées dans 80 ml de BTS à 37°C. Une dose est constituée de 5 paillettes contenant 800 millions de spermatozoïdes, soit 4 milliards de spermatozoïdes totaux.

Un contrôle des chaleurs a été pratiqué dès l'arrivée des truies, deux fois par jour, avec un verrat souffleur. Les truies ont été inséminées dès leur venue en chaleur après au moins une semaine de présence à l'élevage. Des inséminations ont été pratiquées à 12 et 36 heures (n=4) ou à 24 et 36 heures (n=11) ou encore à 24 et 48 heures (n=2) après le début des chaleurs. Certaines truies ont été ré-inséminées après un retour en chaleur après la première I.A..

Les truies échographiées pleines sont réparties vers leur élevage d'origine à un stade de gestation compris entre 61 et 91 jours pour y mettre bas.

1.2. Devenir des verrats issus de la décongélation

1.2.1. Elevage et typage Halothane des verrats PBO

Dix verrats issus de la décongélation ont été transférés vers 3 mois d'âge dans un même élevage pour y être élevés ensemble en bâtiment, jusqu'à 7 mois. Ceci, afin de choisir 6 verrats (4 destinés à la reproduction en élevage et 2 pour entrer en CIA) sur la base de leur morphologie et de leur génotype au locus RYR1 / Halothane.

1.2.2. Entrée en CIA des verrats et congélation de leur semence

Des analyses (sérologies et contrôles de la semence par le Laboratoire National de Contrôle des Reproducteurs) ont été pratiquées sur les verrats en quarantaine avant leur entrée en centre de production de semence, conformément à la réglementation spécifique à l'entrée des verrats en CIA.

La préparation de doses de semence congelée est réalisée suivant le protocole de Thilmant (1997). L'objectif est de collecter les verrats sur une période de 100 jours de production au maximum et de les réformer lorsque 120 doses de semence congelée sont produites.

2. RESULTATS

2.1. Résultats après insémination avec de la semence décongelée

Le tableau 1 présente le résultat des inséminations en races PBO et Bayeux. Toutes les truies de race PBO inséminées ont mis bas ; deux d'entre elles après une deuxième I.A. double dose suite à un retour en chaleur (à 19 et 25 jours). Le taux de mise bas par cycle d'I.A. double dose est donc de 67%. La prolificité moyenne est de 9 nés totaux par portée dont 8,5 nés vivants : elle est comprise entre 6 et 13 nés vivants par portée. Vingt-huit porcelets sont sevrés dont 14 mâles.

Dix verrats de race PBO obtenus à partir de semence congelée ont été élevés ensemble (les 4 descendants du vertrat 418 et 6 des 10 descendants du vertrat 153). Parmi eux, 4 verrats de génotype HAL NN (deux descendants par père) ont été choisis pour la monte naturelle en élevage et 2 verrats hétérozygotes au locus RYR1 / HAL (un descendant par père) ont été retenus pour entrer en CIA afin de congeler leur semence. Les autres verrats ont été réformés afin d'uniformiser la taille de descendance des deux verrats nés en 1989 par rapport aux autres mâles en activité.

D'autre part, 9 femelles de race PBO issues du programme de décongélation de semence sont actuellement retenues comme

futures reproductrices (4 issues du vertrat 418 et 5 issues du vertrat 153).

Les truies de race Bayeux sont plus âgées que les truies PBO (rang moyen 4,7 contre 2,8). Elles présentent des chaleurs hétérogènes mais en moyenne plus longues que les PBO (56 heures contre 48 heures). Les truies Bayeux en chaleur dans les heures qui ont suivi leur arrivée n'ont pas été inséminées au cours du premier cycle car la détection était imprécise (début des chaleurs inconnu et/ou femelles farouches).

Au total, sept truies de race Bayeux ont été inséminées (1 à 4 I.A. double dose par truie). Seule une truie a mis bas, soit un taux de mise-bas par I.A. double dose de l'ordre de 8 % : la prolificité est de 3 nés totaux dont 2 femelles nées vivantes et retenues comme futures reproductrices. D'autre part, une truie a été échographiée pleine à 24 jours puis est revenue en chaleurs 64 jours post I.A.. Les autres retours en chaleurs ont été enregistrés 18 à 43 jours post insémination.

2.2. Résultats de la congélation

Le tableau 2 indique les caractéristiques moyennes des éjaculats et des doses de semence produites par les verrats PBO nés à partir de semence congelée. Neuf collectes ont été réalisées et 1327 paillettes produites (265 doses). Deux tiers des doses sont destinées à la Cryobanque Nationale et 1/3 au stock de travail (stock à la disposition des organisations membres du LIGERAL pour gérer la variabilité génétique des races locales).

2.3. Etat actualisé des stocks de semence porcine de type I en Cryobanque Nationale

Le tableau 3 donne l'état actuel des stocks de semence porcine française dans la Cryobanque Nationale pour le matériel de type I (races menacées).

3. DISCUSSION

Seule la saillie naturelle est pratiquée dans les élevages de races locales porcines. Les éleveurs n'ont donc pas l'habitude de

Tableau 1 - Résultats des inséminations avec de la semence congelée en races PBO et Bayeux

	Race PBO	Race Bayeux
Nombre de truies inséminées	4	7
Rang de portée moyen des truies	2,8	4,7
Nombre total d'I.A. double dose	6	13
Nombre total de mises bas	4	1
Nombre de nés vifs / portée (morts nés)	8,5 (0,5)	2 (1)
Nombre total de sevrés (par sexe)	28 (14 femelles, 14 mâles)	2 (2 femelles, 0 mâle)

Tableau 2 - Caractéristiques moyennes des éjaculats et des doses de semence produites par les verrats PBO issus de la décongélation

Verrat	Nombre de spz*	% de spz* mobiles	Note de mobilité	Nombre de paillettes/éjaculat (nombre total)	10 minutes post décongélation		120 minutes post décongélation	
					% de spz* mobiles	Note de mobilité	% de spz* mobiles	Note de mobilité
017	64	83	36	75 (677)	57	40	44	38
080	59	84	36	72 (650)	50	40	43	39

*spz : spermatozoïdes (en milliards)

Tableau 3 - Etat actuel des stocks de semence porcine française dans la Cryobanque Nationale
Matériel de type I : races menacées

	PBO*	Bayeux	Basque	Gascon	Limousin	Total
Nombre de verrats	30	19	27	25	27	128
Nombre de doses en pastilles	100	53	114	121	126	514
Nombre de doses en paillettes	1384	975	1162	1000	1120	5641
Nombre total de doses	1484	1028	1276	1121	1246	6155

* inclut les 176 doses produites dans le cadre du présent projet et déposées dans la Cryobanque Nationale.
Les doses en stock de travail ne sont pas comptabilisées.

contrôler les durées de chaleurs ni de pratiquer des inséminations artificielles. C'est pourquoi les truies ont été transférées à l'U.E.I.C.P pour y être inséminées par du personnel compétent.

Les résultats sont très décevants en race Bayers puisqu'une seule truie sur 7 a mis bas et n'a donné naissance qu'à 2 femelles vivantes. Il était initialement prévu de pratiquer au maximum 2 I.A. double dose par truie (un seul retour en chaleur post I.A. « admis ») sur 4 truies par race. Au vu des résultats défavorables en race Bayers, une truie a néanmoins été inséminée sans succès sur 4 cycles et 3 truies « remplaçantes » ont été choisies.

Plusieurs facteurs peuvent expliquer cet échec. Les truies Bayers impliquées dans l'étude étaient de parité élevée (2 à 8) à l'image des animaux de la section Bayers-Longué ; on observe fréquemment des problèmes de reproduction lorsque des multipares sont regroupées. Le taux de consanguinité élevé des truies inséminées (compris entre 0,10 et 0,21 et en moyenne de 0,18) pourrait également être associé aux mauvais résultats de reproduction. Il faut toutefois souligner le fait que les éleveurs de la race Bayers ne rencontrent pas de problèmes de reproduction en saillie naturelle. Les truies présentaient d'autre part un parasitisme externe à leur arrivée et, pour l'une d'entre elles, une forte métrite. Un traitement antibiotique approprié a été appliqué à l'ensemble des femelles. Une explication d'ordre sanitaire peut donc aussi être avancée. Les truies Bayers montraient par ailleurs une grande agressivité entre elles. Les bagarres peuvent conduire à des arrêts prématurés de la gestation comme le laissent penser quelques retours en chaleur décalés (29 jours à 64 jours). D'autre part, la qualité de la semence était plutôt médiocre, quoique meilleure en Bayers qu'en PBO (données non montrées). Enfin, les caractéristiques méconnues de reproduction des truies Bayers pourraient expliquer les mauvaises performances de reproduction en semence congelée : les durées de chaleurs hétérogènes et parfois très longues (jusqu'à 103 heures) ne facilitent pas l'optimisation du protocole d'insémination.

De façon similaire, Labroue et al. (2000a) rapportent des résultats médiocres (3 mises bas pour 13 inséminations) en race Basque avec de la semence décongelée. Les caractéristiques de reproduction des truies Basques (durée de chaleurs et intervalles début des chaleurs-ovulation plus longs que ceux des types génétiques couramment utilisés) ainsi que la conduite de l'insémination ont été mises en cause mais pas la qualité de la semence.

A l'inverse, l'expérience est très concluante en Porc Blanc de l'Ouest : avec 8,5 nés vifs par portée, les performances de reproduction obtenues avec de la semence décongelée sont très proches de celles observées en saillie naturelle : 7,7 nés vifs par portée selon Lenoir et al. (2002). Pour chaque verrat dont la semence a été décongelée, l'objectif était de produire au maximum deux mâles destinés aux élevages et un mâle destiné au CIA. Cet objectif a été atteint. Les quatre verrats envoyés en élevage sont tous de génotype NN au locus RYR1 / HAL afin de ne pas compromettre le programme d'élimination de l'allèle n financé depuis plusieurs années par le CRAPAL. Les verrats entrés en CIA pour congeler leur semence sont eux de génotype Nn en l'absence d'autres verrats NN satisfaisants. Leur production spermatique (62 milliards de spermatozoïdes par éjaculat collecté en fraction riche) est tout à fait acceptable quoique légèrement plus faible que celle de verrats Large White collectés sur la même période à un âge proche (81 milliards de spermatozoïdes par éjaculat). La qualité des semences produites est bonne avant congélation et acceptable après décongélation. L'objectif de production de 120 doses de semence par verrat a bien été atteint (265 doses produites). Un tiers des doses de semence congelée produites reste à la disposition des éleveurs pour constituer un stock de travail dédié à la gestion de la variabilité génétique de la race. Les deux tiers restants sont déposés en Cryobanque Nationale. Les stocks de la Cryobanque Nationale ont augmenté de 158 doses PBO (après déduction des 18 doses PBO utilisées pour les inséminations et les génotypages au locus RYR1 / HAL) grâce au présent projet.

Par mesure de sécurité, les stocks de la Cryobanque Nationale sont répartis sur deux sites distincts au cas où le matériel stocké sur l'un des sites serait accidentellement perdu. Pour les populations menacées, l'objectif est de conserver, sur chaque site, un nombre suffisant de doses de semence pour assurer le renouvellement d'une race éteinte par croisements en retour de femelles d'une autre race. Pour cela, les recommandations décrites par Labroue et al. (2000a) sont de cryo-conserver le sperme de 25 verrats (de semence de fécondité convenable après décongélation), à raison de 80 doses par verrat. Après 6 générations, on peut ainsi espérer récupérer 94% du génome d'une race. Ces calculs supposent l'obtention de 0,67 femelle fertile par I.A. double dose. Même si toutes les femelles ne seront pas mises à la reproduction, on peut aisément penser que le nombre de

femelles fertiles par cycle d'I.A. dépassera 0,67 en PBO puisque 14 femelles ont été sevrées suite aux 6 I.A. double dose (dont 9 mises à la reproduction). Par contre, dans l'expérience réalisée en race Bayeux, le chiffre de 0,67 n'a pas été atteint puisqu'au maximum deux femelles seront fertiles après 13 I.A. double dose, soit au maximum 0,15 femelle fertile par I.A. double dose. Cette expérience décevante souligne qu'il est délicat d'extrapoler les conditions et résultats d'insémination classiques (schéma d'insémination optimisé, etc.) à une race dans laquelle l'insémination artificielle n'est pas pratiquée en routine.

Actuellement, 6155 doses de semence de races locales porcines sont stockées en Cryobanque Nationale. Malgré la collecte de deux nouveaux verrats PBO, l'état actuel des stocks de semence congelée diffère encore du prévisionnel affiché par Labroue et al. (2000b) : 7678 doses étaient prévues. La différence s'explique par une productivité plus faible qu'attendue des verrats à la fin du projet européen : en particulier, 440 doses en moins en Gascon, 172 en Limousin et 145 en Bayeux. De nouvelles campagnes de congélation se justifieraient donc. Des financements spécifiques devraient toutefois être trouvés car le coût total de collecte d'un verrot était estimé par Labroue et al. (2000b) à 1164 € par verrot (pour 80 doses par verrot).

CONCLUSION

Ce projet constitue la toute première utilisation de matériel entreposé dans la Cryobanque Nationale. Le bilan mitigé obtenu souligne l'intérêt d'approfondir les connaissances sur les caractéristiques de reproduction des races afin d'optimiser l'utilisation de semence décongelée. L'expérience prouve par ailleurs que la semence stockée dans la Cryobanque Nationale peut servir à recréer des lignées éteintes et, par ce biais, contribuer à la gestion de la variabilité génétique des races en conservation. La Cryobanque Nationale est donc complémentaire des actions de conservation sur pied et n'a pas pour seul objectif de permettre la reconstitution d'une race en cas d'extinction. Les éleveurs de races locales sont d'ailleurs motivés pour lancer de nouvelles campagnes de décongélation.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient la Cryobanque Nationale, le Syndicat des éleveurs de PBO, l'Association des éleveurs de Bayeux-Longué, le CRAPAL (Conservatoire des Races Animales en Pays de la Loire) et l'Ecomusée du Pays de Rennes pour leurs contributions financières au projet ainsi que le LIGERAL pour son soutien et Messieurs Vasseur pour l'élevage des verrats.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bishop M.N.H., Campbell R.C., Hancock J.L., Walton H., 1954. Semen characteristics and fertility in the bull. *J. Agric. Sci.*, 44, 227.
- Labroue F., Guillouet P., Marsac H., Boisseau C., Luquet M., Arrayet J., Martinat-Botté F., Terqui M., 2000a. Etude des performances de reproduction de 5 races locales porcines françaises. *Journées Rech. Porcine*, 32, 413-418.
- Labroue F., Luquet M., Guillouet P., Bussière J.F., Glodek P., Wemheuer W., Gandini G., Pizzi F., Delgado J.V., Poto A., Ollivier L., 2000b. La cryoconservation des races porcines menacées de disparition. La situation en France, en Allemagne, en Italie et en Espagne. *Journées Rech. Porcine*, 32, 419-427.
- Lenoir H., Luquet M., Mercat M.J., 2002. Effectifs et performances de reproduction des 5 races locales porcines françaises. *Techniporc*, 25, 25-30.
- Maignel L., Labroue F., 2001. Analyse de la variabilité génétique des races porcines collectives et des races locales en conservation à partir de l'information généalogique. *Journées Rech. Porcine*, 33, 111-117.
- Meuwissen T.H.E., Luo Z., 1992. Computing inbreeding coefficients in large populations. *Génét. Sel. Evol.*, 24, 305-313.
- Paquignon M., Quellier P., Dacheux J.L., 1986. Congélation du sperme de verrot : comparaison de différents dilueurs, technique de préparation de la semence, modes de conditionnement et températures de décongélation. *Ann. Zootech.*, 35, 173-184.
- Thilmant P., 1997. Congélation du sperme de verrot en paillettes de 0,5 ml. Résultats sur le terrain, *Ann. Méd. Vét.*, 141, 457-462.