

Note

Déséquilibres de linkage entre les locus Hal (Hyperthermie maligne) PHI et 6-PGD dans deux lignées *Piétrain*

G. GUÉRIN, L. OLLIVIER (*) et P. SELLIER (*)

avec la collaboration technique de Marie-Reine LANGLOIS et P. DANDO

Laboratoire de Génétique biochimique,

() Station de Génétique quantitative et appliquée,
Centre national de Recherches zootechniques, I.N.R.A.
78350 Jouy-en-Josas, France*

Résumé

Un échantillon de 250 porcs de *Piétrain* provenant de deux lignées sélectionnées depuis 3 générations, l'une (A) pour la vitesse de croissance et l'épaisseur de lard et l'autre (B) pour l'hypertrophie musculaire, a été soumis à un test à l'halothane et les génotypes ont été déterminés pour deux enzymes du globule rouge (PHI et 6-PGD). La présence parmi les animaux sensibles à l'halothane de 11 sujets hétérozygotes au locus de la PHI démontre formellement que le gène de structure de cette enzyme et le gène responsable du SHM (Hal) sont situés à deux locus distincts. Les deux lignées diffèrent par la valeur du déséquilibre de linkage entre Hal et PHI qui est très hautement significatif dans la lignée A et non significatif dans la lignée B. La fréquence de l'allèle Hal^s responsable du SHM est significativement plus forte dans la lignée B que dans la lignée A en considérant une pénétrance de Hal^s égale à 0,75, ce qui confirme l'hypothèse d'une association entre l'hypertrophie musculaire et le syndrome d'hyperthermie maligne. L'augmentation observée de la fréquence de l'allèle PHI^B en lignée B par rapport à la lignée A est vraisemblablement due au déséquilibre existant entre les locus Hal et PHI et non à un effet propre du locus PHI sur le développement musculaire.

Le syndrome d'hyperthermie maligne chez le porc semble être gouverné par un gène autosomal récessif à pénétrance élevée (voir par exemple OLLIVIER *et al.*, 1975). Nous désignerons ce gène par Hal^s et l'allèle normal par Hal^t. Une association entre la sensibilité des animaux à l'halothane, agent anesthésiant qui permet de détecter le syndrome, et le génotype aux locus de la phosphohexose isomérase

(PHI) et du groupe sanguin H a été montrée par JØRGENSEN *et al.* (1977) chez les Landrace Danois, Néerlandais et Belge. Cette observation a été précisée par la mise en évidence d'une liaison étroite entre les locus Hal et PHI (ANDRESEN et JENSEN, 1977). La liaison entre les locus de la PHI et de la 6-phosphogluconate déshydrogénase (6-PGD) a d'autre part été démontrée par ANDRESEN (1971). Chez le Piétrain, ANSAY et OLLIVIER (1978) ont mis en évidence un déséquilibre de linkage entre les locus Hal et PHI alors qu'il n'y a pas de déséquilibre entre les locus Hal et 6-PGD d'une part, PHI et 6-PGD d'autre part. L'étude des déséquilibres de linkage entre les locus Hal, PHI et 6-PGD a été poursuivie chez le Piétrain et les résultats présentés ici portent sur un échantillon de 250 porcs, mâles et femelles, anesthésiés au poids vif de 20-25 kg à l'élevage d'Avord (Cher). Ces porcs proviennent de deux lignées A et B sélectionnées à partir d'une même population initiale depuis 3 générations, l'une (A) pour une plus forte vitesse de croissance et une moindre épaisseur de lard dorsal, et l'autre (B) pour l'hypertrophie musculaire appréciée visuellement.

Le sang a été récolté à la veine cave immédiatement avant l'épreuve à l'halothane dont les modalités sont décrites par OLLIVIER *et al.* (1975). Les échantillons ont été prélevés en tubes vacutainer héparinés, lavés trois fois avec une solution de NaCl 0,9 p. 100. Les culots de globules rouges sont conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation. Les culots sont alors décongelés à la température du laboratoire, dilués deux fois avec de l'eau distillée et agités sur vortex pour provoquer l'hémolyse. Les hémolysats sont centrifugés pendant 30 mn à 1 500 g et la partie supérieure est utilisée pour l'électrophorèse.

Les échantillons ont été analysés par électrophorèse en gel d'amidon selon une méthode très voisine de celle de BENGTTSSON et SANDBERG (1973). La dimension des plaques était de $23 \times 8 \times 0,6$ cm, la concentration en amidon de 11 p. 100, la migration de 18 h sous une tension de 6 V/cm à $+4^{\circ}\text{C}$; enfin le tampon phosphate a été ajusté à pH 7,0 avec NaOH. Nous avons aussi utilisé l'électrophorèse sur acétate de cellulose (Cellogel $5,7 \times 14$ cm, Chemetron, Italie), selon la technique de WIDAR *et al.* (1975) avec un temps de migration de 1 h 30 mn pour la PHI et de 30 mn pour la 6-PGD. Dans les deux méthodes nous avons employé la coloration spécifique des deux enzymes selon BENGTTSSON et SANDBERG (1973).

Les déséquilibres de linkage entre les locus Hal, PHI et 6-PGD ont été estimés par les méthodes de HILL (1974), modifiées pour prendre en compte une valeur (supposée connue) de la pénétrance (w) de l'allèle récessif au locus Hal. Les calculs ont été faits avec $w = 1$ et $w = 0,75$.

Pour les tests statistiques, il a été ajouté aux variances d'échantillonnage que donnent les méthodes précédentes, des variances dues à la dérive génétique qui résulte de l'effectif limité des deux lignées. Pour un gène de fréquence p , on sait que la variance de dérive est égale à $Fp(1-p)$, F étant le coefficient de consanguinité. Les valeurs de F utilisées ici sont les accroissements de consanguinité calculés d'après les pedigrees dans les deux lignées au cours des 3 générations écoulées depuis le moment où elles ont été séparées, soit 0,03 dans la lignée A et 0,04 dans la lignée B. Les effets de la sélection sur la dérive des fréquences géniques ont été ignorés, car ils sont négligeables dans les premières générations de sélection (voir NICHOLAS et ROBERTSON, 1976). Les effets de la dérive génétique sur le déséquilibre de linkage ont été étudiés par HILL et ROBERTSON (1968) qui donnent des expressions permettant de calculer la variance du déséquilibre D à chaque génération en fonction de trois moments (impliquant D et les fréquences géniques) à la génération précédente et deux paramètres, l'effectif génétique N et le taux de recombinaison c . Les valeurs initiales de ces moments sont calculées à partir des

valeurs de D et des fréquences géniques estimées globalement sur l'ensemble des deux lignées. Quant aux deux paramètres, l'effectif génétique N est déduit de l'accroissement de consanguinité calculé plus haut, soit $N = 50$ dans la lignée A et $N = 38$ dans la lignée B, et les taux de recombinaison c utilisés sont ceux proposés par ANDRESEN et JENSEN (1977), soit 0 entre Hal et PHI et 0,06 entre PHI et 6-PGD. Les effets éventuels de la sélection sur D et sur sa variance de dérive ont été ignorés.

Les données du tableau 1 confirment celles d'ANSAY et OLLIVIER (1978) qui rapportaient l'existence, parmi 57 animaux sensibles à l'halothane, d'un sujet

TABLEAU I

Répartition des animaux dans les deux lignées selon leur sensibilité à l'halothane et leur phénotype pour la PHI et la 6-PGD
Distribution of the pigs in the two lines according to halothane sensitivity and phenotype for PHI and 6-PGD

Lignée (Line)		A		B	
Sensibilité à l'halothane Halothane sensitivity PHI 6-PGD		Non sensibles Non reactors	Sensibles Reactors	Non sensibles Non reactors	Sensibles Reactors
AA	AA . . .	5	—	—	—
	AB . . .	4	—	—	—
	BB . . .	—	—	—	—
AB	AA . . .	39	3	12	7
	AB . . .	21	1	—	—
	BB . . .	—	—	—	—
BB	AA . . .	10	33	9	44
	AB . . .	6	25	5	22
	BB . . .	1	3	—	—

de phénotype PHI AB. Les onze animaux de ce type trouvés dans notre étude démontrent de manière formelle que le gène de structure de l'enzyme PHI et le gène responsable de la sensibilité à l'halothane sont situés à deux locus distincts.

Le déséquilibre de linkage (tabl. 2) calculé entre les trois locus PHI, 6-PGD, Hal pris deux à deux n'est significatif que pour le couple PHI-Hal ($P < 0,001$)⁽¹⁾ et seulement dans la lignée A. Il implique une fréquence des combinaisons alléliques $\text{PHI}^A \text{Hal}^s$ et $\text{PHI}^B \text{Hal}^+$ inférieure à celle attendue (« répulsion ») et par conséquent une fréquence supérieure des combinaisons $\text{PHI}^B \text{Hal}^s$ et $\text{PHI}^A \text{Hal}^+$ (« attraction »)

(1) La prise en compte de l'hypothèse de pénétrance incomplète ($w = 0,75$) dans la méthode d'estimation a peu d'effet sur le déséquilibre estimé mais accroît la variance de l'estimateur.

TABLEAU 2

Fréquences géniques (\pm écart-type)
 et déséquilibres de linkage relatifs aux trois locus Hal, PHI et 6-PGD dans les deux lignées
 Gene frequencies (\pm standard error)
 and linkage disequilibria relative to the three loci Hal, PHI and 6-PGD in the two lines

Allèles et locus <i>Alleles and loci</i>	Lignée A <i>A line</i>	Lignée B <i>B line</i>	Test <i>t</i> des différences entre lignées (b) <i>t test for differences between lines</i>
Fréquence génique (<i>Gene frequency</i>) :			
PHI ^A	0,272 \pm 0,081	0,096 \pm 0,063	§
6-PGD ^A	0,785 \pm 0,075	0,864 \pm 0,073	NS
Hal ^s (a) {	$w = 1$	0,656 \pm 0,088	§
	$w = 0,75$	0,758 \pm 0,082	**
Déséquilibre de linkage (<i>Linkage disequilibrium</i>) :			
PHI et 6-PGD	0,021 NS	0,013 NS	NS
PHI et Hal {	$w = 1$	0,161 ***	§
	$w = 0,75$	0,182 ***	*
6-PGD et Hal {	$w = 1$	0,025 NS	NS
	$w = 0,75$	0,029 NS	NS

(a) *w* : Pénétrance de l'allèle Hal^s (*Penetrance of the Hal^s allele*).

(b) NS : Non significatif ($P > 0,10$) (*Not significant*) ($P > 0,10$).

§ $P < 0,10$.

* $P < 0,05$.

** $P < 0,01$.

*** $P < 0,001$.

qui explique l'association entre le génotype de la PHI et la sensibilité à l'halothane, déjà observée par JØRGENSEN *et al.* (1977).

L'examen du tableau 2 confirme la prédominance des allèles PHI^B et 6-PGD^A dans la race de *Piértrain* (ANSAY et OLLIVIER, 1978). De plus on observe une fréquence de l'allèle Hal^s plus élevée dans la lignée B que dans la lignée A : la différence est significative au seuil de 1 p. 100 pour $w = 0,75$ et atteint le seuil de 10 p. 100 pour $w = 1$. La fréquence des animaux sensibles à l'halothane passe de 43 p. 100 en lignée A à 73 p. 100 dans la lignée B; il est tentant de penser que cette augmentation est due à la sélection en faveur d'un très fort développement musculaire dans la lignée B, selon l'hypothèse, avancée par OLLIVIER *et al.* (1975), d'une association positive entre le syndrome d'hyperthermie maligne et l'hypertrophie musculaire.

Une augmentation significative au seuil de 10 p. 100, de la fréquence de l'allèle PHI^B est observée en lignée B par rapport à la lignée A. Elle est vraisemblablement due au déséquilibre de linkage qui tend à associer cet allèle à l'allèle Hal^s et non à un effet propre du locus PHI sur le développement musculaire, hypothèse en accord avec l'étude de ANSAY et OLLIVIER (1978) sur le taux de créatinine plasmatique.

Il semble, à ce stade, nécessaire de préciser la position du locus Hal par une

étude de la ségrégation simultanée des allèles aux locus Hal, PHI, 6-PGD chez les descendants d'animaux hétérozygotes, et de clarifier les incidences sur ces trois locus du mode de sélection appliqué dans les deux lignées.

Reçu pour publication en avril 1978.

Remerciements

Nous remercions D. TANGUY (Génétique animale, Jouy-en-Josas) pour la mise au point des programmes de calculs.

Summary

Linkage disequilibria between the Hal (malignant hyperthermia), PHI and 6-PGD loci in two Pietrain lines

Two hundred and fifty *Pietrain* pigs from two lines selected for 3 generations, one (A line) on a combination of average daily gain and backfat thickness and the other (B line) on muscular hypertrophy, were submitted to a halothane-test and their genotypes determined for two red cell enzymes (PHI and 6-PGD). The occurrence in the halothane sensitive group of 11 animals heterozygous at the PHI locus definitely proves that the structural gene of this enzyme and the gene controlling MHS (Hal) are located at two distinct loci. The two lines differ with respect to the linkage disequilibrium between Hal and PHI, which is very highly significant in the A line and not significant in the B line. The frequency of the Hal^s allele responsible for SHM is significantly higher in the B line than in the A line, assuming a penetrance of Hal^s equal to 0.75, which is in favour of the hypothesis of an association between muscular hypertrophy and malignant hyperthermia syndrome. Moreover, the higher frequency of the PHI^B allele observed in the B line compared to the A line is probably due to the linkage disequilibrium found between the Hal and PHI loci, and not to a real effect of the PHI locus on muscular development.

Références bibliographiques

- ANDRESEN E., 1971. Linear sequence of the autosomal loci PHI, H and 6-PGD in pigs. *Anim. Blood Grps biochem. Genet.*, **2**, 119-120.
- ANDRESEN E., JENSEN P., 1977. Close linkage established between the Hal locus for halothane sensitivity and the PHI locus in pigs of the *Danish Landrace* breed. *Nord. Vet. Med.*, **29**, 502-504.
- ANSAY M., OLLIVIER L., 1978. Créatinine plasmatique et sensibilité du porc au syndrome d'hyperthermie maligne. Relations avec deux enzymes du globule rouge (PHI et 6-PGD). *Ann. Génét. Sél. anim.*, **10**, 9-16.
- BENGTSSON S., SANDBERG K., 1973. A method for simultaneous electrophoresis of four horse red cell enzyme systems. *Anim. Blood Grps biochem. Genet.*, **4**, 83-87.
- HILL W. G., 1974. Estimation of linkage disequilibrium in randomly mating populations. *Heredity*, **33**, 229-239.
- HILL W. G., ROBERTSON A., 1968. Linkage disequilibrium in finite populations. *Theor. Appl. Genet.*, **38**, 226-231.
- JØRGENSEN P. F., HYLDEGAARD-JENSEN J., EIKELÉNBOOM G., MOUSTGAARD J., 1977. Meat quality, halothane sensitivity and blood parameters. In *Proceedings 3rd intern. Conf. on Production Disease in Farm Animals*, 200-202, Pudoc, Wageningen.
- NICHOLAS F. W., ROBERTSON A., 1976. The effect of selection on the standardized variance of gene frequency. *Theor. Appl. Genet.*, **48**, 263-268.
- OLLIVIER L., SELLIER P., MONIN G., 1975. Déterminisme génétique du syndrome d'hyperthermie maligne chez le porc de *Pietrain*. *Ann. Génét. Sél. anim.*, **7**, 159-166.