

Détection de QTL pour la teneur en lipides intramusculaires et les activités enzymatiques lipogéniques dans un croisement entre porcs Meishan et Large White

Catherine LARZUL (1), Jean-Pierre BIDANEL (1), Nathalie IANNUCCELLI (2), Joseph GRUAND (3),
Jacques MOUROT (4), Denis MILAN (2)

(1) INRA, UR337 SGQA, 78350 Jouy-en-Josas
(2) INRA, UMR444 LGC, 31326 Castanet-Tolosan
(3) INRA, UE967 GEPA, 86480 Rouillé
(4) INRA, UMR SENAH, 35590 Saint Gilles

catherine.larzul@jouy.inra.fr

Détection de QTL pour la teneur en lipides intramusculaires et les activités enzymatiques lipogéniques dans un croisement entre porcs Meishan et Large White

Des analyses uni- et multivariées ont été réalisées pour localiser des locus à effet quantitatif (QTL) sur la teneur en lipides intramusculaires (LIM) dans le muscle Long dorsal (LD), sur le poids de panne et sur des activités enzymatiques mesurées dans le LD et le gras de bardière (B) : l'acétyl-CoA-carboxylase, l'enzyme malique et la glucose-6-phosphate déshydrogénase. L'analyse porte sur 245 porcs mâles F2 Meishan x Large White descendants de 4 verrats F1 accouplés à 15 truies F1 en utilisant 132 marqueurs. Les analyses unicaractères ont permis de localiser des QTL pour la LIM sur les chromosomes 4 et 7, et pour le poids de panne sur les chromosomes 3 et 7. Sur le chromosome 7, les allèles d'origine Meishan sont associés à des valeurs élevées de LIM et de l'activité de l'enzyme malique ainsi qu'à un faible poids de panne. Les QTL ayant un effet sur une activité enzymatique étaient peu nombreux, et localisés sur les chromosomes 4, 7 et 18. Les analyses multicaractères ont permis de détecter des QTL sur deux chromosomes supplémentaires (SSC15 et SSC16) ayant des effets sur la LIM et les activités enzymatiques. Sur le chromosome 7, deux QTL pléiotropiques distincts ont été localisés, le premier affectant la LIM et le poids de panne, le second affectant les activités de l'enzyme malique mesurée dans LD et de la glucose-6-phosphate déshydrogénase mesurée dans LD et B. Hormis pour le chromosome 7, les effets de substitution n'ont pas permis de déterminer des effet cohérents entre la LIM et les activités enzymatiques.

Detection of quantitative trait loci for intramuscular fat content and lipogenic enzyme activities in Meishan x Large White F2 pigs

A univariate and multivariate quantitative trait locus (QTL) analysis of Longissimus dorsi (LD) muscle fat content, leaf weight and acetyl-CoA-carboxylase, malic enzyme and glucose-6-phosphate deshydrogenase activities in LD and backfat (BF) was performed on 245 F2 Meishan x Large White male pigs issued from 4 F1 boars and 15 F1 sows. A whole genome scan was performed using 132 markers covering the entire porcine genome. Univariate analyses detected QTL on chromosome 4 and 7 for intramuscular fat content and on chromosome 3 and 7 for leaf fat weight. For chromosome 7, Meishan alleles were associated with higher intramuscular fat content and malic enzyme activity and lower leaf fat weight. Few QTL were detected for enzyme activities; they were located on chromosome 4, 7 and 18. Multivariate analyses allowed locating additional QTL affecting intramuscular fat content and enzyme activities on chromosome 15 and 16. On chromosome 7, two distinct pleiotropic QTL were detected. One affected intramuscular fat content and leaf fat weight and the other one affected enzyme malic and glucose-6-phosphate deshydrogenase activities in LD and glucose-6-phosphate deshydrogenase activity in BF. For all chromosomes but 7, substitution effects were highly variable between sire families and could not allow disclosing a clear pattern for Meishan vs Large White alleles or for joint effects on enzyme activities and intramuscular fat content.

INTRODUCTION

La teneur en lipides intramusculaires (LIM) est une composante majeure de la qualité organoleptique de la viande de porc (Fernandez et al., 1999). Le niveau moyen observé à l'heure actuelle est généralement considéré comme trop faible dans des pièces comme la longe. Avec des héritabilités estimées plutôt élevées (Sellier, 1998), l'augmentation de cette teneur par sélection est tout à fait envisageable, mais reste malaisée à organiser compte tenu de la difficulté et du coût de la mesure. Par ailleurs, les corrélations génétiques étant modérément défavorables entre l'adiposité de la carcasse et la teneur en lipides intramusculaires (Sellier, 1998), une augmentation de la teneur en LIM pourrait conduire à terme à des carcasses plus grasses.

L'intérêt de trouver des marqueurs moléculaires associés à des teneurs en lipides intramusculaires élevées est donc double. Il s'agit non seulement de pouvoir identifier à partir des typages moléculaires des animaux candidats à la sélection en limitant le nombre de mesures phénotypiques à réaliser, mais aussi de « casser » la corrélation génétique défavorable en privilégiant des zones du génome ayant uniquement un effet sur les lipides intramusculaires et non sur l'adiposité en général. Des locus à effet quantitatif (QTL) sur la teneur en LIM ont déjà été détectés dans plusieurs populations et croisements porcins (Hu et al., 2005) mais aucun QTL portant sur les activités d'enzymes impliqués dans le métabolisme des lipides n'a pour l'instant été décrit chez le porc. Cependant, il a été montré que certaines activités enzymatiques étaient corrélées avec la teneur en LIM (Gondret et Hocquette, 2006).

Nous avons mis en place un croisement F2 entre Meishan et Large White en vue de localiser des QTL affectant les caractères économiquement importants (Bidanel et al., 2001; Milan et al., 2002). Par ailleurs, Gilbert et al. (2007) ont montré l'intérêt d'une approche multicaractère pour localiser des QTL ayant des effets sur plusieurs caractères simultanément. Cette approche a permis de montrer, sur le chromosome 7, des QTL affectant indépendamment le gras de couverture et le gras interne, et un QTL affectant simultanément le gras interne et la teneur en lipides intramusculaires. L'objectif de cette étude est de présenter les résultats d'une analyse multicaractère sur le génome entier en considérant les lipides intramusculaires, les activités de trois enzymes lipogéniques et le gras interne.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1. Population expérimentale

Le dispositif PORQTL est un dispositif sur 3 générations mis en place sur l'unité expérimentale INRA de Génétique Expérimentale en Production Animale (GEPA, 17700 Surgères). En résumé, des accouplements entre six verrats Large White (LW) et 6 truies Meishan ont été réalisés pour produire des animaux F1, qui, accouplés entre eux (1 verrot x 3-4 truies), ont servi à produire des animaux F2. Dans cette étude, 245 mâles castrés issus de 4 verrats et 15 truies F1 ont été retenus. Ils ont été élevés en cases de 10 porcs en structure semi-ouverte. L'aliment (17 % protéine, 3100 kcal énergie digestible) était distribué à volonté durant toute la période de contrôle (10 à 22 semaines d'âge). Les animaux ont été abattus dans un abattoir expérimental INRA, au poids vif de 90 kg.

1.2. Caractères mesurés

Le lendemain de l'abattage, la demi-carcasse droite a été découpée en 7 morceaux (Milan et al., 2002). Des échantillons de muscle et de gras ont été prélevés dans le long dorsal et la bardière, respectivement. Les lipides totaux du muscle LD ont été mesurés par extraction à froid dans un mélange chloroforme-méthanol selon Folch et al. (1957). Les activités de trois enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique, l'acétyl-CoA-carboxylase (ACC), l'enzyme malique (EM) et la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), ont été mesurées dans le muscle LD et la bardière (B). Les activités de EM et G6PD ont été mesurées selon les méthodes de Fitch et al. (1959) et Hsu and Lardy (1969), respectivement. L'activité de ACC a été déterminée par la méthode de fixation de $H^{14}CO_3$ (Chang et al., 1967).

Huit caractères sont donc considérés dans cette étude : la teneur en lipides intramusculaires du muscle LD (LIM), le poids de panne (PPa), les activités de l'acétyl-CoA-carboxylase, de l'enzyme malique et de la glucose-6-phosphate déshydrogénase dans le muscle LD et dans la bardière (ACCLD, ACCB, EMLD, EMB, G6PDLD, G6PDB, respectivement). Bien que déjà étudié par Milan et al. (2002), le poids de panne a été conservé pour la présente analyse car un QTL agissant à la fois sur le poids de panne et sur la teneur en LIM a déjà été localisé sur le chromosome 7 (Gilbert et al., 2007).

1.3. Génotypage et construction de la carte

Un réseau de 132 marqueurs microsatellites couvrant les 18 autosomes a été constitué, le nombre de marqueurs par chromosome variant de 3 à 12 (Bidanel et al., 2001). Des analyses de liaison multipoints ont été réalisées à l'aide de la version 2.4 du logiciel CriMap (Green et al., 1990).

1.4. Analyses statistiques

Pour les activités enzymatiques, les données ont préalablement été normalisées via une transformation logarithmique. Avant l'analyse QTL proprement dite, les données ont été pré corrigées pour tenir compte des effets de la bande ou de la date d'abattage et du poids d'abattage.

La détection de QTL a été réalisée à l'aide du logiciel QTLMAP (Gilbert et Le Roy, 2003). Des analyses uni-caractères et multicaractères ont été réalisées. Les analyses multicaractères ont été conduites comme décrit par Gilbert et Le Roy (2003) en réalisant dans un premier temps des analyses univariées successives sur une combinaison linéaire des caractères en réduisant progressivement le nombre de caractères considérés. Des applications de cette méthode sont décrites par Rosendo et al. (2007) et Gilbert et al. (2007). Le choix final des caractères varie d'un chromosome à l'autre. Dans un second temps, une analyse multivariée a été réalisée pour les caractères retenus pour estimer les effets du QTL sur chaque caractère dans chaque famille de père.

Les seuils de rejet de l'hypothèse nulle (H_0) ont été estimés par simulations de Monte Carlo des données sous H_0 (2000 simulations pour chaque chromosome) en supposant une distribution multinormale des caractères, avec une matrice de corrélations résiduelles obtenue à partir des données pré-corrigées. Une correction de Bonferroni a été appliquée pour tenir compte du nombre de chromosomes.

Tableau 1 - Moyennes et écarts-types des activités enzymatiques, de la teneur en lipides intramusculaires et du poids de panne, corrélations résiduelles

	ACCLD	EMLD	G6PDL	ACCB	EMLB	G6PDB	LIM	PPa
Moyenne	0,39	2,41	0,29	1,17	12,3	16,9	1,70	0,95
Ecart type	0,28	1,13	0,24	1,09	7,2	8,5	0,46	0,04
EMLD	0,01							
G6PDL	-0,03	0,08						
ACCB	-0,03	0,14	0,13					
EMB	0,02	0,13	-0,01	0,11				
G6PDB	0,01	0,02	0,02	0,17	0,38			
LIM	-0,03	0,60	0,20	0,06	0,06	-0,08		
PPa	0,07	-0,11	-0,01	-0,13	0,10	-0,02	-0,03	

ACC : acétyl-CoA-carboxylase, exprimée en log (nmol HCO₃⁻ incorporée/min/g muscle ou gras) ; EM : enzyme malique, G6PD : glucose-6-phosphate déshydrogénase, exprimées en log (μmol NADPH incorporée/min/g muscle ou gras) ; LD : muscle long dorsal, B : bardière ; LIM : teneur en lipides intramusculaires du long dorsal (%), PPa : poids de panne, kg.

2. RESULTATS - DISCUSSION

Les moyennes, écarts types et corrélations entre caractères sont présentés dans le tableau 1.

La teneur en lipides intramusculaires est fortement corrélée avec l'activité de l'enzyme malique dans le muscle LD et modérément corrélée avec l'activité de la G6PD dans le muscle LD. La teneur en LIM n'est pas significativement corrélée avec l'activité de ACC dans le muscle LD. D'une manière générale, les activités mesurées dans le muscle ou dans la bardière sont faiblement corrélées entre elles.

Les analyses unicaractères (Tableau 2) ont permis de localiser des QTL pour la teneur en LIM sur les chromosomes 4 et 7, et pour le poids de panne sur les chromosomes 3 et 7. Les QTL ayant un effet sur une activité enzymatique sont peu nombreux, et sont localisés sur les chromosomes 4, 7 et 18. Aucun QTL n'a été détecté pour EMB et G6PDB.

Les analyses multicaractères (Tableau 3) ont permis de détecter des QTL sur deux chromosomes supplémentaires, à savoir les chromosomes 15 et 16.

Le QTL pléiotropique localisé sur le chromosome 4 n'est pas issu des analyses multi-caractères telles que décrite précédemment. En effet, aucun QTL n'apparaissait significatif au niveau du chromosome lorsque toutes les variables étaient incluses dans l'analyse. L'analyse a donc été effectuée en n'utilisant que les deux caractères pour lesquels un QTL était détecté en analyse

Tableau 2 - Localisation des QTL détectés par les analyses unicaractères, niveau de significativité et effet de substitution entre les allèles Meishan et Large White exprimé en écart type du caractère

Chromosome	Position (cM)	Probabilité	Caractère	Effet MS-LW
3	57	+	PPa	0,020
4	0	+	LIM	-0,018
	0	+	G6PDL	0,060
7	40	*	PPa	-0,419
	78	*	LIM	0,369
	79	*	EMLD	0,358
	102	*	ACCB	0,227
18	15	+	ACCLD	-0,030

+ : P < 0,05 au niveau du chromosome ; * : P < 0,05 au niveau du génome.

unicaractère. Cette analyse bi-caractère a permis de mettre en évidence un QTL très significatif (5 % au niveau du génome). Sur le chromosome 7, le QTL ayant un effet sur la teneur en LIM et le poids de panne, précédemment décrit par Gilbert et al. (2007) a été retrouvé, avec une position légèrement différente. Il faut noter que les animaux utilisés dans la présente étude ne représentent qu'un sous-échantillon du total des animaux mesurés sur la teneur en LIM et PPa. Par ailleurs, nous avons refait des analyses multicaractères sur le chromosome 7 en excluant les deux variables LIM et PPa pour éventuellement localiser un deuxième QTL ayant un effet pléiotropique sur les 6 caractères restants. Nous avons ainsi détecté un deuxième QTL, proche du précédent (à 6 cM), ayant un effet sur 3 activités enzymatiques.

Tableau 3 - Localisation des QTL détectés par les analyses multicaractères, niveau de significativité et effet de substitution entre les allèles Meishan et Large White exprimé en écart-type du caractère

Chromosome	Position (cM)	probabilité	Caractères	Effet MS-LW
4	0	*	G6PDL	0,061
			LIM	-0,019
7	83	*	LIM	0,375
			PPa	-0,406
7	89	+	EMLD	0,346
			G6PDL	0,190
			ACCB	0,228
15	112	+	EMLD	-0,144
			G6PDL	0,002
			G6PDB	0,205
16	50	*	ACCLD	-0,210
			EMLD	0,112
			EMB	0,161
			LIM	-0,013
18	49	*	EMLD	-0,082
			G6PDL	-0,100
			G6PDB	0,018
			LIM	0,076

+ : P < 0,05 au niveau du chromosome ; * : P < 0,05 au niveau du génome.

Au total, 4 QTL ayant un effet sur la teneur en LIM, significatifs à 5 % au niveau du génome, ont été détectés. Le QTL détecté sur le chromosome 7 a un allèle Meishan qui augmente la teneur en lipides intramusculaire et diminue le poids de panne. Les trois autres QTL ont des effets sur une ou plusieurs activités enzymatiques, mesurées dans le muscle LD ou la bardière. Contrairement aux QTL détectés sur le chromosome 7, les signes des effets de substitution varient d'un père à l'autre. Par exemple, sur le chromosome 4, l'allèle Meishan a un effet minorant sur l'activité de G6PDL et sur la teneur en LIM par rapport à l'allèle LW dans une des familles, alors qu'il a un effet négatif sur la teneur en LIM et positif sur G6PDL dans une autre famille. Compte tenu du faible nombre d'animaux par famille, il est difficile de réellement conclure sur des différences d'effet entre familles. Cependant, l'augmentation de la teneur en lipides intramusculaires associée à des augmentations d'activités enzymatiques du métabolisme lipidique n'apparaît pas clairement établie pour tous les QTL pléiotropiques.

L'ensemble des QTL affectant la teneur en lipides intramusculaires reflète mal les corrélations positives entre la teneur en LIM et les activités de EM et G6PD dans le muscle LD. En effet, la plupart des effets de substitution sont de signes opposés pour ces deux groupes de caractères. Seuls les QTL détectés sur le chromosome 7 sont cohérents avec les corrélations phénotypiques. Il faut toutefois noter que, bien que localisés à des positions très proches, les analyses multicaactères ont mis en évidence deux QTL affectant indépendamment ces deux groupes de caractères. La précision de la localisation de ces QTL ne permet pas de conclure directement sur le fait qu'ils soient ou non différents. Des analyses complémentaires utilisant une densité de marqueurs supérieure dans cette zone devraient permettre de confirmer ou d'infirmer l'existence de deux QTL différents.

Les QTL ayant un effet sur les activités enzymatiques ne sont pas localisés dans les régions où sont cartographiés les gènes de structure codant pour ces enzymes. Le gène de l'enzyme malique est localisé sur le chromosome 1, le gène de l'acétyl-CoA-carboxylase sur le chromosome 12 et le gène de la glucose-6-phosphate déshydrogénase sur le chromosome X. Ils sont plus vraisemblablement situés dans des régions abritant des régulateurs de ces activités enzymatiques.

Des QTL de teneur en lipides intramusculaires ont été rapportés dans la littérature sur de nombreux chromosomes et dans plu-

sieurs croisements. Dans les études impliquant un croisement avec des animaux Meishan, des QTL de la teneur en LIM ont été localisés sur les chromosomes 1, 2, 4, 6, 7, 9, 13 et X (Hu et al., 2005). Sur les deux chromosomes communs avec la présente étude pour des QTL de la teneur en LIM, les localisations sont différentes. Sur le chromosome 4, la position du QTL est à 65-70 cM et sur le chromosome 7, deux localisations ont été identifiées à 13 et 113 cM. Aucune étude n'a rapporté à ce jour des localisations de QTL pour les activités enzymatiques impliquées dans le métabolisme des lipides.

CONCLUSION

Les analyses multicaactères ont permis de mettre en évidence plusieurs QTL ayant un effet sur la teneur en lipides intramusculaires, certains d'entre eux n'étant pas détectés par l'approche unicaactère. La prise en compte d'activités enzymatiques susceptibles d'influencer la teneur en lipides intramusculaire, pouvait permettre de mettre en évidence des QTL privilégiant certaines voies métaboliques. Les résultats obtenus sont, de ce point de vue, relativement hétérogènes. Aucun QTL comportant un allèle ayant un effet clairement établi dans le sens de l'augmentation d'une activité enzymatique entraînant elle-même une augmentation de la teneur en lipides intramusculaires n'a pu être mis en évidence. Les résultats varient en effet fortement d'une famille à l'autre. Les résultats les plus cohérents de notre étude sont obtenus pour les deux QTL localisés sur le chromosome 7 avec des allèles Meishan induisant une augmentation des activités enzymatiques, notamment de l'enzyme malique et de la glucose-6-phosphate déshydrogénase dans le muscle long dorsal, et une augmentation de la teneur en lipides intramusculaires.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été financée par un programme européen (Bridge and Biotech+ programs), par l'INRA (Département de Génétique Animale et AIP "structure des génomes animaux") et par le "Groupement de recherches et d'études sur les génomes" du Ministère de la Recherche. Le typage des animaux a été réalisé par Labogena (<http://www.labogena.fr>).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bidanel J.P., Milan D., Iannuccelli N., Amigues Y., Boscher M.Y., Bourgeois F., Caritez J.C., Gruand J., Le Roy P., Lagant H., Quintanilla R., Renard C., Gellin J., Ollivier L., Chevalet C., 2001. Detection of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Genet. Sel. Evol.*, 33, 289-309.
- Chang H. C., Seidman I., Teebor G., Lane D.M., 1967. Liver acetyl-CoA-carboxylase and fatty acid synthetase: Relative activities in the normal state and in hereditary obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 28, 682-686.
- Fernandez X., Monin G., Talmant A., Mourou J., Lebret B., 1999. Influence of intramuscular fat content on the quality of pig meat - 1. Composition of the lipid fraction and sensory characteristics of m. longissimus lumborum. *Meat Sci.*, 53, 59-65.
- Fitch W.M., Hill R., Chaikoff I.L., T 1959. The effect of fructose feeding on glycolytic enzyme activities of the normal rat liver. *J. Biol. Chem.*, 234, 1048-1051.
- Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509.
- Gilbert H., Le Roy P., 2003. Comparison of three multitrait methods for QTL detection. *Genet. Sel. Evol.*, 35, 281-304.
- Gilbert H., Bidanel J.P., Milan D., Le Roy P., 2007. Linked and pleiotropic QTL influencing carcass composition traits detected on porcine chromosome 7. *Genet. Res.*, 89, 65-72.
- Gondret F., Hocquette J.F., 2006. La teneur en lipides de la viande : une balance métabolique complexe. *INRA Prod. Anim.*, 19, 327-338.
- Green P., Falls K., Crooks S., 1990. Documentation for CRIMAP version 2.4, Washington University School of Medicine, St. Louis.
- Hsu R.Y., Lardy H.A., 1969. Malic enzyme. *Methods In Enzymology* (Lowenstein J.M., ed), Academic Press, New-York and London 13, 230-235.
- Hu Z., Dracheva S., Jang W., Maglott D., Bastiaansen J., Rothschild M.F., Reecy J.M., 2005. A QTL resource and comparison tool for pigs: PigQTLDB. *Mamm. Genome*, 16, 792-800.
- Milan D., Bidanel J.P., Iannuccelli N., Riquet J., Amigues Y., Boscher M.Y., Bourgeois F., Caritez J.C., Gruand J., Le Roy P., Lagant H., Quintanilla R., Renard C., Gellin J., Ollivier L., Chevalet C., 2002. Detection of quantitative trait loci for carcass composition traits in pigs. *Genet. Sel. Evol.*, 34, 705-728.
- Rosendo A., Bidanel J.P., Milan D., Billon Y., Runier A., Gilbert H., 2007. Détection de locus à effets quantitatifs pour les caractères de reproduction de la truie à l'aide de méthodes multi-caractères. *Journées Rech. Porcine*, 39, 243-248.
- Sellier P., 1998. Genetics of meat and carcass traits. In: Rothschild M. F. and Ruvinsky A. (Eds.), *The Genetics of the Pig*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, 463-510.