

Recherche de causes génétiques des anomalies congénitales majeures chez le porc

*Juliette RIQUET (1), Marie-José MERCAT (2), Nathalie IANNUCELLI (1), Bertrand SERVIN (1), Eric PAILHOUX (3),
Catherine LARZUL (4)*

(1) INRA, UMR444, LGC, 31326 Castanet-Tolosan, France

(2) IFIP-Pôle génétique, la Motte au Vicomte, 35651 Le Rheu cedex, France

(3) INRA, UMR1198, BDR, 78352 Jouy-en-Josas, France

(4) INRA, UMR1313, GABI, 78352 Jouy-en-Josas, France

juliette.riquet@toulouse.inra.fr

Avec la collaboration des Organisations de Sélection Porcine membres de BIOPORC : ADN, GENE+, Nucleus et Pen Ar Lan

Recherche de causes génétiques des anomalies congénitales majeures chez le porc

Bien que la fréquence des anomalies congénitales soit relativement faible (environ 1%), leur impact en production porcine est significatif. Elles provoquent le plus souvent un mal-être des animaux et une dépréciation des carcasses à l'abattoir induisant des pertes économiques. Les anomalies les plus courantes chez le porc sont les hernies inguinales/scrotales, la cryptorchidie et l'intersexualité. En 2006, BIOPORC (l'IFIP et les Organisations de Sélection Porcine ADN, GENE+, Nucleus et Pen Ar Lan) a inscrit cette problématique dans ses priorités et deux programmes de recherche, ANOPORC (Ministère de l'Agriculture 2007-2008) et SwAn (ANR 2009-2012), ont été mis en place en partenariat entre l'INRA et BIOPORC. L'objectif de cette présentation est de faire un état des lieux de la banque de données phénotypiques et moléculaires mise en place dans le cadre d'ANOPORC et de présenter les premiers résultats d'utilisation de cette collection pour la recherche des gènes responsables de l'apparition de ces anomalies (SwAn). Les outils moléculaires disponibles chez le porc permettent en effet de réaliser aujourd'hui une analyse systématique de l'ensemble du génome et de mettre en évidence les régions chromosomiques portant des gènes responsables de ces défauts ou de leur apparition en interaction avec l'environnement. Un signal fort d'association entre le caractère intersexué et des marqueurs d'une petite région du chromosome 12 a été identifié. Ces résultats prometteurs seront présentés afin d'illustrer la stratégie également mise en œuvre sur les hernies scrotales/inguinales et la cryptorchidie.

Genetic factors influencing major congenital anomalies in pigs.

Although the incidence of congenital anomalies is quite low (around 1%), it is a significant problem in the pig industry. These defects have a serious impact on animal welfare and result in economic losses due to carcass depreciation. The most important congenital defects that occur in piglets are scrotal or inguinal hernias, cryptorchidism, and intersexuality. In 2006, it was declared a priority by BIOPORC (IFIP and the French pig breeding companies ADN, GENE+, Nucleus and Pen Ar Lan) and two research projects, ANOPORC (Ministère de l'Agriculture 2007-2008) and SwAn (ANR 2009-2012), were initiated in collaboration with INRA. The aim of this paper was to describe the phenotypic and molecular datasets, developed as part of the ANOPORC project, and to present some of the first findings from the efforts to identify genes underlying congenital anomalies (SwAn). Available molecular tools in swine enable large scale, genome wide association studies to identify chromosomal regions containing causal genes. A strong association signal has been identified between intersexuality and a small region located on chromosome 12. These results are just one example of the approach that will be used to identify genes involved in scrotal/inguinal hernias and cryptorchidism.

INTRODUCTION

L'existence d'anomalies congénitales chez le porc est une préoccupation importante en production porcine en raison du mal-être des animaux et des pertes économiques qu'elles entraînent. Les anomalies les plus fréquentes sont les hernies scrotales et inguinales, la cryptorchidie et l'intersexualité ; dans une moindre mesure les atrophies ou dissymétries testiculaires, les atrophies de la vulve, les anus imperforés (atrésie anale), le prognathisme facial, le phimosis, la rétention urinaire et les tremblements sont également rencontrés dans les élevages (à différents étages de la pyramide de production). Au total, toutes anomalies confondues, on estime que 1% des animaux seraient touchés, et en Europe la perte économique due à ces défauts est estimée à plusieurs millions d'euros par an. L'impact de ces défauts sur le bien-être des animaux n'est également pas à sous-estimer, certaines de ces anomalies causant une mortalité accrue des porcelets, d'autres nécessitant l'euthanasie des animaux. Parallèlement aux facteurs alimentaires et environnementaux, des causes génétiques ont été mises en évidence pour les principales anomalies et plusieurs études ont été réalisées afin d'estimer les paramètres génétiques dans différentes races porcines.

Dans les populations françaises, des valeurs d'héritabilité de 0,37, 0,11 et 0,81 ont respectivement été obtenues pour les hernies scrotales/inguinale, la cryptorchidie et l'intersexualité (Larzul *et al.*, 2008). Au cours des dix dernières années, l'avancée des connaissances en génomique porcine a permis d'envisager la recherche des causes moléculaires sous-jacentes et l'identification des gènes et mutations causales.

Si de nombreuses équipes scientifiques ont entrepris cette recherche, aucune mutation n'a pu être identifiée à ce jour. Depuis 2006, les organisations de sélection porcine (OSP) ADN, GENE+, Nucleus et Pen Ar Lan et l'IFIP, fédérés au sein de BIOPORC, ont décidé de mettre en place, en collaboration avec l'INRA, un dispositif de recherche destiné à développer un outil moléculaire permettant la contre sélection de ces défauts dans les populations porcines françaises.

Dans un premier temps, des fiches descriptives des principales anomalies ont été réalisées pour servir d'appui aux professionnels afin de réaliser au fur et mesure du temps une collection de données phénotypiques et d'échantillons biologiques exploitables en génétique moléculaire (programme ANOPORC). Depuis janvier 2009, cette collection est utilisée dans le cadre d'une étude d'association pangénomique afin d'identifier les régions du génome contenant les gènes responsables des anomalies (ou de leur apparition) les plus fréquentes (programme SwAn).

La démarche suivie et les premiers résultats obtenus dans le cadre de ce programme sont présentés.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Les animaux

Les animaux utilisés dans le cadre du programme SwAn sont issus de la collection ANOPORC. L'échantillonnage est réalisé au sein de portées présentant au moins un porcelet atteint d'une anomalie (voire deux descendants dans le cas des hernies). Une prise de sang ou un échantillon biologique est prélevé sur les porcelets atteints, sur deux pleins-frères (sœurs) sains du même sexe que les animaux malades et sur

leurs mères. Parallèlement, une description de l'anomalie est enregistrée. Cette collection est réalisée, pour l'essentiel, dans des noyaux de sélection d'animaux de race pure issus des OSP membres de BIOPORC et des unités expérimentales INRA. Quelques familles intersexuées sont issues de croisements réalisés à l'INRA entre 1991 et 1997. Tous les échantillons sont stockés à l'INRA, excepté l'échantillon de chaque père, chaque verrat étant systématiquement stocké dans d'autres collections de matériel (BAP : Banque d'ADN Porcine ou autre). Parmi la collection ANOPORC, un premier lot de 309 animaux atteints a été sélectionné comprenant 170 animaux présentant une hernie scrotales, 79 cryptorchides et 60 intersexués ainsi que leurs parents respectifs.

Un échantillon d'ADN a été préparé pour chaque individu afin de réaliser (1) un contrôle de filiation à l'aide d'un jeu de 10 marqueurs microsatellites et de valider les apparentements au sein de chaque famille nucléaire, (2) le génotypage du locus SRY par PCR à l'aide d'un couple d'amorces ciblant le gène, et (3) le génotypage des marqueurs SNP (Single Nucleotide Polymorphism).

1.2. L'analyse de la puce SNP

L'analyse de marqueurs moléculaires balisant la totalité du génome a été réalisée à l'aide de la puce pangénomique 60K. Cette puce générique, commercialisée par Illumina, a été développée dans le cadre d'un consortium international impliquant les laboratoires de recherche majeurs travaillant sur le porc. Cet outil permet de déterminer simultanément le génotype d'un individu pour 64 232 marqueurs moléculaires de type SNP. En moyenne, chaque intervalle génétique de 1 cM est balisé par une vingtaine de marqueurs bi-alléliques.

1.3. Analyse statistique

Un TDT (Transmission Disequilibrium Test) a été réalisé pour chaque marqueur (Spielman *et al.*, 1993). Le principe consiste à tester s'il existe, au sein de familles nucléaires, une distorsion de transmission d'un des deux allèles d'un parent hétérozygote vers sa descendance atteinte. Ce test permet de détecter une association entre un marqueur (SNP) et une maladie **en présence** de liaison gamétique. La robustesse du TDT résulte dans le fait que le test de liaison permet d'exclure des marqueurs présentant des associations fortuites avec la maladie en raison, par exemple, d'une structuration en sous-populations.

Tableau 1 – Synthèse des différentes transmissions alléliques possibles d'un parent à sa descendance pour un SNP bi-allélique (génotypes possibles : A/A, A/C et C/C).

		Allèle non transmis	
		Allèle A	Allèle C
Allèle transmis	Allèle A	a	b
	Allèle C	c	d

Les cellules grisées d'effectif a et d, correspondent aux situations où le parent est homozygote A/A ou C/C.

Pour chaque marqueur, la transmission des allèles de chaque parent à sa descendance peut être résumée selon le tableau 1.

Afin de tester la liaison, seuls les parents hétérozygotes pour le SNP sont pris en compte dans le TDT (correspondant aux effectifs b et c du tableau 1). La distorsion de transmission (lorsque les ratios $b/(b+c)$ et $c/(b+c)$ sont significativement différents de 0,5) peut être testée à l'aide d'un test de χ^2 à un degré de liberté.

2. RESULTATS

2.1. La collection ANOPORC

La collection ANOPORC a été initiée en 2006 et est destinée à recueillir des échantillons pour n'importe quelle anomalie congénitale porcine. L'objectif initial était d'obtenir le plus

rapidement possible, pour les anomalies les plus fréquentes, un minimum de 100 familles nucléaires (père, mère, descendants sains et atteints). En moyenne, les familles d'une trentaine d'animaux atteints sont collectées chaque mois. La figure 1 présente l'évolution de cette collection depuis sa création. Au 1^{er} juillet 2010, la base ANOPORC comprenait 1484 échantillons d'animaux atteints d'une anomalie congénitale. Les anomalies les plus fréquemment représentées sont les hernies scrotales et inguinales (46%), la cryptorchidie (24%) et l'intersexualité (11%). Les cas de hernie ombilicale, de splayleg, de trembleur représentent 14% de la collection. Enfin pour certaines maladies rares, moins de 3 familles ont été collectées à ce jour.

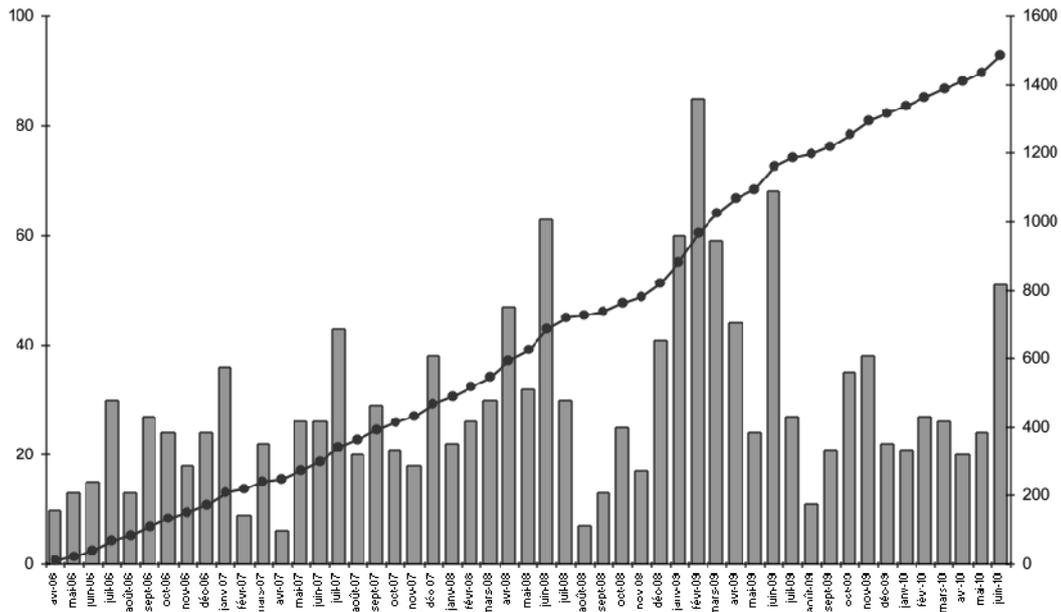


Figure 1 - Evolution du nombre d'échantillons d'animaux atteints d'une anomalie congénitale collectés depuis avril 2006 (nombre mensuel (échelle de gauche) et nombre cumulé (échelle de droite)).

2.1. Analyse moléculaire de la collection ANOPORC

Seuls les résultats obtenus à partir des familles intersexuées seront présentés comme illustration de la démarche du programme de recherche SwAn.

Chez le porc la fréquence de l'intersexualité varie de 0,1 à 0,5% chez les femelles. Ce défaut est le plus souvent détecté en cours de croissance en raison du développement de caractères morphologiques de type mâle, parfois à l'abattoir par l'identification de testicules en position abdominale. A l'abattoir, l'incidence de l'intersexualité est estimée supérieure à 0,2%. Les conséquences en élevage de cette anomalie sont des problèmes de stérilité, d'infections génitales, de croissance réduite et de déclassement de carcasses à l'abattoir en raison de problèmes de teneur accrue en androsténone. Ces animaux peuvent également présenter des comportements plus agressifs en élevage. Chez le porc, trois origines possibles de cas d'intersexualité ont été identifiées dans les années 1990. La première identifiée (4% des cas), est la conséquence de mosaïcisme induisant la présence simultanément de cellules des deux sexes, 38XX et 38XY (19 paires de chromosomes dont une paire de chromosomes sexuels respectivement XX ou XY). La seconde, et la moins fréquente (2% des cas), résulte de la

présence d'une petite portion du chromosome Y, contenant le gène SRY (Sex-determining Region of the Y chromosome), chez des individus de caryotype (38XX). Dans ces deux cas l'intersexualité est due à la présence et à l'expression du gène SRY, identifié en 1990 comme étant le facteur induisant la première étape de la différenciation gonadique en testicule, à partir de la crête urogénitale foetale.

Les cas d'intersexualité de la catégorie la plus fréquente (94%) sont des animaux de caryotype femelle (38XX) pour lesquels le phénotype intersexué est indépendant de l'expression du locus SRY. Ces cas seraient déterminés par un ou plusieurs locus autosomaux (Pailhoux *et al.*, 2001). L'objectif de ce programme étant de rechercher les gènes (autres que SRY) induisant des problèmes d'inversion sexuelle, un criblage SRY préalable des animaux collectés a été réalisé.

Parmi les individus classés intersexués, 9 ont répondu positivement au test de recherche de SRY et ont été écartés de la suite de l'analyse. Au total, 60 animaux atteints issus de 21 pères et de 36 mères différents ont été sélectionnés pour être génotypés à l'aide de la puce 60 K.

Parmi les familles sélectionnées certaines étaient issues de la collection ANOPORC, d'autres provenaient des familles collectées à l'INRA dans les années 1990.

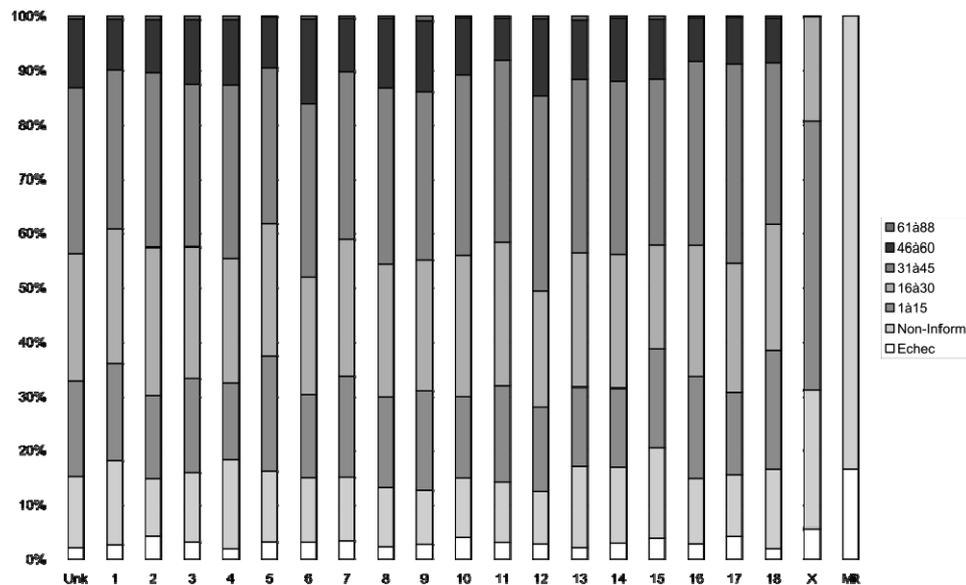


Figure 2 - Informativité des marqueurs SNP de la puce 60K utilisée pour l'analyse des familles LW intersexuées. Les marqueurs sont répartis en classes de nombres de méioses exploitables dans l'analyse TDT. Ces pourcentages sont indiqués pour chaque chromosome (Unk : chromosome inconnu (ensemble des marqueurs non assignés pour le moment à un chromosome) ; 1 à 18 : chacun des 18 autosomes (du chromosome 1 au chromosome 18), X : chromosome X, Mit : mitochondrie).

Le programme SwAn étant un des premiers programmes à tirer parti de la puce 60K, peu d'informations étaient disponibles sur la qualité de cet outil, comme l'informativité des marqueurs génotypés. Les 64 232 SNP constituant cette puce ont été choisis sur la base des fréquences alléliques de chaque marqueur, calculées sur un échantillonnage d'animaux issus de races et populations différentes.

Dans le cas de l'étude que nous avons réalisée sur les animaux intersexués, les familles sélectionnées et analysées en TDT étaient toutes de race LW. La figure 2 résume le nombre de marqueurs informatifs par chromosome : 16% des SNP en moyenne n'ont pu être exploités dû à un échec de génotypage ou parce que l'ensemble des parents du dispositif étaient homozygotes (et donc non-informatifs). En moyenne, sur l'ensemble du génome, 58% des marqueurs

permettaient au mieux de ne tirer parti que de 30 méioses sur les 120 du dispositif (2 méioses x 60 descendants intersexués). En moyenne, ces taux sont équivalents quel que soit l'autosome. Par ailleurs, intra-chromosome, les marqueurs les moins informatifs sont répartis tout au long du chromosome.

Le segment chromosomique le plus long, homozygote chez tous les fondateurs de ces familles, est localisé sur le chromosome 4 et est constitué de 16 marqueurs non-informatifs successifs couvrant un intervalle de 1 Mb.

Ces résultats confirment que ces approches moléculaires ne peuvent être entreprises que lorsque le nombre de familles nucléaires et de descendants atteints collectés ne sont pas trop faibles, la perte d'informativité entraînant une perte de puissance pour l'analyse d'association.

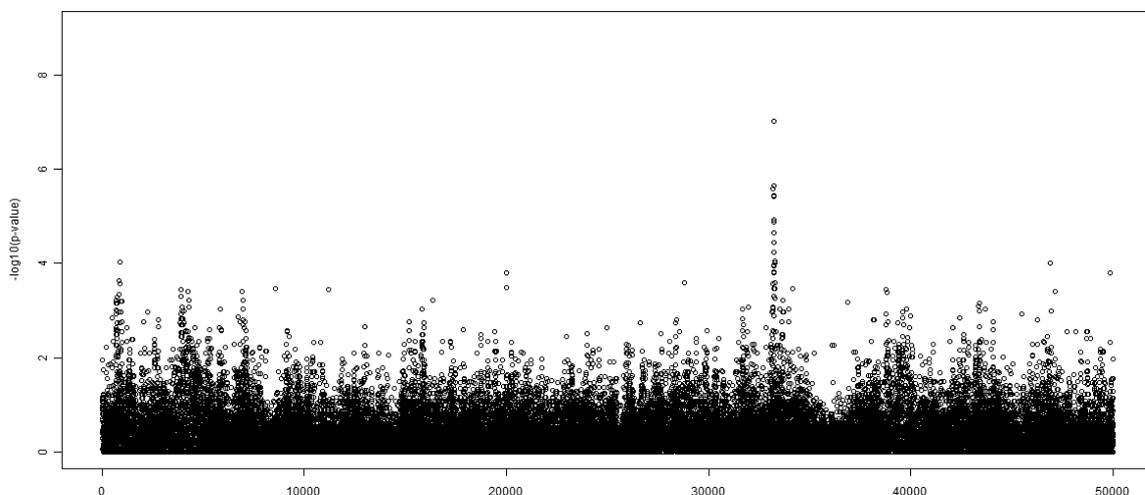


Figure 3 - Résultats des analyses TDT réalisées pour chacun de SNP informatifs de la puce pangénomique. Sur l'axe des X, les marqueurs informatifs sont ordonnés le long du génome ; l'axe des Y indique la valeur $-\log_{10}(p\text{-value})$ du test de χ^2 réalisé. La flèche indique les marqueurs les plus significatifs localisés sur le chromosome 12.

L'analyse TDT a été réalisée pour l'ensemble des familles génotypées et pour chaque SNP de la puce pangénomique (Figure 3). Les 18 marqueurs les plus significatifs (p -value $< 10^{-4}$) sont tous localisés dans un seul intervalle du chromosome 12. Le marqueur présentant l'association la plus importante est significatif au seuil de 5% à l'échelle du génome (correction pour le nombre d'analyses réalisées à partir de l'ensemble des marqueurs testés). Pour ce marqueur, 36 méioses ont été prises en compte dans l'analyse TDT : 34 fois l'allèle « A » a été transmis d'un parent hétérozygote à sa descendance atteinte alors que l'allèle « G » n'a été transmis que deux fois. Des analyses TDT ont été également réalisées sur deux sous-jeux de familles correspondant aux animaux nés dans les années 1990 dans les unités expérimentales INRA et les familles de la collection ANOPORC collectées depuis 2006. Les résultats obtenus indiquent que chaque sous-ensemble contribue au signal global obtenu, et permettent de conclure que la même cause génétique est responsable du phénotype intersexué chez ces animaux échantillonnés à 15 ans d'intervalle environ.

Les études de ségrégation initiales semblaient indiquer que cette anomalie pouvait être déterminée par plusieurs locus ; les résultats obtenus dans cette analyse portent à croire qu'en population LW, l'intersexualité est causée essentiellement par un seul gène.

Jusqu'à présent ces analyses nous ont permis de cartographier ce locus dans un intervalle de petite taille (2 Mb) comprenant un gène candidat potentiel.

Au cours des mois à venir, un échantillonnage de familles complémentaires de la collection ANOPORC sera génotypé à l'aide de la puce afin de confirmer ce résultat et de tenter de réduire l'intervalle de localisation. Parallèlement, un sous-jeu de marqueurs spécifiques de la région candidate sera analysé sur les demi-sœurs non-intersexuées collectées comme échantillons témoins : les allèles des marqueurs préférentiellement associés à la maladie doivent être sous-représentés dans l'échantillonnage des animaux sains.

A plus long terme, le séquençage systématique d'animaux intersexués et d'animaux témoins sera réalisé afin de rechercher l'ensemble des variations de séquence différenciant, dans cet intervalle, les animaux sains des malades.

Ces travaux de cartographie fine, combinés à des analyses fonctionnelles des gènes de la région, devraient nous permettre d'aboutir à l'identification de marqueurs moléculaires utilisables en sélection assistée par marqueurs voire à l'identification de la mutation causale.

CONCLUSION

L'objectif des programmes ANOPORC et SwAn était de caractériser les causes moléculaires associées aux anomalies congénitales majeures affectant la production porcine française. Nous avons fait le choix de mener cette recherche à partir d'animaux issus des schémas de sélection et non via la mise en place de croisements expérimentaux dans les unités expérimentales de l'INRA. Compte tenu de la fréquence relativement faible de ces anomalies, les 3 premières années ont été destinées à mettre en place, documenter et enrichir la base ANOPORC.

Depuis janvier 2009, des recherches moléculaires ont été initiées. Les résultats obtenus à partir d'animaux atteints d'intersexualité, présentés ci-dessus sont prometteurs ; parallèlement la même démarche a été suivie à partir de familles atteintes d'hernies scrotales/inguinales et de cryptorchidie. Des résultats intéressants ont été obtenus pour les hernies, que nous devons néanmoins confirmer dans les mois à venir.

Les causes de ces anomalies sont peu connues et d'origines diverses (alimentation, sanitaire et génétique).

Ce travail devrait nous permettre de mieux connaître les facteurs génétiques de certaines maladies et de prendre en compte le génotype des animaux aux gènes responsables dans le choix des reproducteurs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Larzul C., Delaunay I., Schwob S., Mercat M.J., 2008. Paramètres génétiques des principales anomalies congénitales porcines. Journées Rech. Porcine, 40, 141-142.
- Pailhoux E., Pepin-Mandon B., Cotinot C., 2001. Mammalian gonadal differentiation : the pig model. *Reproduction*. Suppl 58, 65-80.
- Spielman R.S., McGinnis R.E., Ewens W.J. (1993). "Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM)". *Am J Hum Genet.* 52 (3), 506-16.

