

Utilisation de marqueurs génétiques pour réduire les odeurs sexuelles chez les porcs canadiens

*Laurence MAIGNEL (1), Mohsen JAFARIKIA (1,2), Jim SQUIRES (2), Flavio SCHENKEL (2), Stefanie WYSS (1),
Frédéric FORTIN (3), Wim VAN BERKEL (4), Rod DE WOLDE (5), Brian SULLIVAN (1)*

*(1) Centre canadien pour l'amélioration des porcs, Ferme Expérimentale Centrale, Edifice #75, 960 avenue Carling, Ottawa,
Ontario, Canada K1A 0C6*

(2) Centre for Genetic Improvement of Livestock, Université de Guelph, Guelph, Ontario, Canada N1G 2W1

*(3) Centre de développement du porc du Québec, Place de la Cité, tour Belle Cour, 2590, boul. Laurier, bureau 450, Québec,
Québec, Canada G1V 4M6*

(4) Western Swine Testing Association, Box 1 Site 5 RR 1, Lacombe, Alberta, Canada T4L 2N1

(5) Ontario Swine Improvement, Box 400, Innerkip, Ontario, Canada N0J 1M0

laurence@ccsi.ca

Utilisation de marqueurs génétiques pour réduire les odeurs sexuelles chez les porcs canadiens

L'objectif de cette étude était d'explorer la possibilité de réduire les taux d'androsténone et de scatol dans les tissus adipeux de mâles entiers au moyen de marqueurs génétiques. Des échantillons de gras ont été prélevés par biopsie ou à l'abattoir sur un total de 3474 mâles entiers. Ces derniers ont été génotypés pour 97 marqueurs SNP localisés dans 40 gènes candidats dont 61, 80 et 83 SNP étaient polymorphiques, respectivement, chez les porcs Duroc, Landrace et Yorkshire. Une analyse en deux étapes a été réalisée pour explorer l'association entre les SNP et les niveaux d'androsténone et de scatol mesurés. Le nombre d'allèles défavorables était significativement lié aux niveaux d'androsténone chez le Duroc et de scatol chez le Landrace. La proportion d'animaux au-dessus du seuil de tolérance pour l'androsténone était de 76% pour les verrats avec au moins 15 allèles défavorables et seulement 20% pour les verrats avec 10 allèles défavorables. Les résultats obtenus jusqu'à présent sont prometteurs quant à l'utilisation de marqueurs génétiques pour réduire les problèmes d'odeurs sexuelles chez les porcs canadiens. Dans le cadre d'un nouveau projet, ces résultats seront validés dans un test commercial. Les verrats Duroc actifs en janvier 2014 dans trois centres d'insémination artificielle canadiens ont été génotypés avec le même panel SNP afin d'identifier deux groupes de verrats ayant un potentiel génétique faible ou élevé pour les odeurs sexuelles. Les porcs commerciaux issus de ces deux groupes subiront un test en station afin de valider les résultats établis préalablement en race pure.

Use of genetic markers to reduce boar taint in Canadian pigs

The objective of this study was to investigate the possibility of reducing the amount of androstenone and skatole in fat tissues of intact males using genetic markers. Fat samples were collected *via* biopsies or at the slaughter plant on a total of 3,474 boars. These animals were also genotyped for 97 SNP markers located in 40 candidate genes, from which 61, 80 and 83 genotyped SNPs were polymorphic in Duroc, Landrace and Yorkshire pigs, respectively. A two-step analysis was performed to examine the association of SNPs with measured androstenone and skatole levels. The number of unfavourable SNP alleles was significantly associated with levels of androstenone in Duroc and with levels of skatole in Landrace. The percentage of animals with androstenone levels above the consumer acceptance threshold was 76% for boars with 15 or more unfavourable alleles and only 20% for boars with 10 unfavourable alleles. The current results offer a promising application with regard to using SNP markers to reduce boar taint risk in Canadian pigs. As part of a new project, these results will be validated in a commercial trial. Active Duroc boars housed in three Canadian artificial insemination centres were genotyped with the same SNP panel to identify two groups of boars that have high and low genetic values for boar taint based on SNP marker genotypes. Commercial pigs born from these two groups will be station-tested to validate the results previously found in purebred populations.

INTRODUCTION

Des problèmes d'odeurs dites « de verrat » peuvent survenir dans la viande issue de mâles entiers. La castration des porcelets est une pratique courante au Canada, comme dans la plupart des autres pays, pour éviter l'apparition de ces odeurs. Il existe cependant un intérêt croissant pour l'élevage de mâles non castrés, pour des questions de bien-être animal mais aussi en raison de la croissance plus efficace des mâles entiers par rapport aux castrats. Les odeurs sexuelles sont causées par l'accumulation d'androsténone et de scatol dans les tissus adipeux. L'androsténone est un stéroïde produit dans les testicules à l'approche de la puberté et joue le rôle de phéromone intervenant dans le développement sexuel des cochettes et dans le réflexe d'immobilité chez les truies. Le scatol résulte de la dégradation bactérienne du tryptophane dans l'intestin (Zamaratskaia et Squires, 2009). La sélection génétique visant à réduire les odeurs sexuelles à un niveau acceptable pour les consommateurs est une solution potentielle pour répondre à cette problématique. Des études passées ont démontré que les deux composés à l'origine des odeurs sexuelles sont modérément à hautement héritables, ce qui suggère que la sélection pour réduire les odeurs chez les mâles entiers est possible. Des chercheurs de l'université de Guelph (Ontario) ont identifié des marqueurs génétiques associés aux odeurs sexuelles, situés dans des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la synthèse et la dégradation de l'androsténone et du scatol. L'objectif de cette étude est d'évaluer la possibilité d'utiliser ces marqueurs génétiques pour réduire les taux d'androsténone et de scatol dans les tissus gras des porcs.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Animaux

Un total de 1771 mâles entiers de race pure présents dans des troupeaux canadiens ont été identifiés et transportés vers différents abattoirs en Alberta, au Québec, en Ohio et en Iowa et suivis individuellement. Après abattage, un échantillon de gras et de muscle d'environ 10 grammes a été prélevé sur la carcasse au niveau de l'épaule. Les échantillons ont ensuite été envoyés à l'Université de Guelph, pour y être analysés (extraction d'ADN et mesure du taux d'androsténone et de scatol). Un protocole d'échantillonnage sur animaux vivants a également été développé à l'aide d'un pistolet à biopsie mis au point initialement par des chercheurs suisses (Baes *et al.*, 2013) et modifié pour les besoins du projet à l'Université de Guelph. L'appareil permet, après avoir immobilisé le porc de prélever un petit cylindre de gras d'environ 0,5 gramme dans la région du cou ou de l'épaule avec un minimum d'inconfort pour l'animal. Au total, 755 mâles entiers vivants ont pu être échantillonnés avec ce procédé. Les mâles entiers échantillonnés dans le cadre de ce projet pesaient de 80 à 195 kg, avec une moyenne de 115,8 kg.

1.2. Dosage des composés à l'origine des odeurs sexuelles

Les échantillons de gras prélevés sur les carcasses et les animaux vivants ont été analysés à l'Université de Guelph, pour la mesure de la teneur en androsténone-5 α et du scatol, respectivement à l'aide d'un test ELISA (Enzyme Linked Immunoassay) (Squires et Lundström, 1997) et d'une méthode HPLC (High Performance Liquid Chromatography) avec détection par fluorescence (Lanther *et al.*, 2007).

1.3. Génotypage

Un nombre total de 590 mâles entiers Duroc, 723 Landrace et 743 Yorkshire échantillonnés ont été génotypés pour 124 marqueurs SNP (single nucleotide polymorphism) situés dans 40 gènes candidats codant pour des gènes impliqués dans la synthèse et la dégradation de l'androsténone et du scatol. Sur un total de 124 SNP initiaux, 97 SNP polymorphiques ont été conservés pour génotyper l'ensemble des animaux.

1.4. Analyses statistiques

1.4.1. Estimation des effets des marqueurs SNP

Une analyse en deux étapes a été réalisée à l'aide des procédures GLM et REG (SAS, Inst. Inc. Cary NC, version 9.2). Puisque la distribution des deux composés mesurés est fortement asymétrique, les teneurs en scatol et androsténone ont été analysées après transformation log. Les génotypes aux différents marqueurs SNP ont été codés 0, 1 et 2, respectivement, pour AA, AB et BB. Les SNP ayant une fréquence d'allèle mineur inférieure à 5% intra-race ont été exclus de l'analyse. Les animaux avec un poids vif inférieur à 90 kg ou supérieur à 150 kg ont également été exclus. Les phénotypes ont été ajustés pour la saison, pour le poids et pour l'âge du verrat au moment de l'échantillonnage. Les résidus de la procédure GLM ont ensuite été analysés avec la procédure REG pour identifier le meilleur modèle expliquant les niveaux de composés d'odeurs sexuelles. Les génotypes aux marqueurs SNP ont été inclus comme covariables dans l'analyse des niveaux d'androsténone et de scatol à l'aide de la méthode 'backward elimination model selection'. Les SNP avec un niveau de significativité supérieur à 10% ($P > 0,10$) ont été éliminés à chaque étape du processus de sélection.

1.4.2. Évaluation assistée par marqueurs

Une méthode en deux étapes a été utilisée avec la procédure GLM (SAS, Inst. Inc. Cary NC, version 9.2) et la méthode GBLUP (VanRaden *et al.*, 2009) à l'aide du logiciel gebv (Sargolzaei *et al.*, 2009). La procédure GLM a été utilisée pour pré-ajuster les phénotypes tel que décrit précédemment. Les résidus de l'analyse GLM ont ensuite été analysés avec le logiciel gebv pour prédire les valeurs génétiques assistées par marqueurs (VGM) des verrats pour l'androsténone et le scatol. Pour tester la précision des VGM, les 80% verrats les plus vieux ont été assignés à un groupe d'apprentissage et les 20% les plus jeunes à un groupe de validation (Tableau 1). Les effets des SNP ont été estimés à partir des phénotypes ajustés et des génotypes des verrats dans le groupe d'apprentissage. Les estimations des effets des SNP ont alors été utilisées pour calculer les VGM des animaux du groupe de validation. Les corrélations entre les VGM et les phénotypes ajustés ont été calculées dans le groupe de validation pour évaluer la valeur prédictive des VGM pour les composés à l'origine des odeurs de verrat.

Tableau 1 - Nombre de verrats dans les groupes d'apprentissage (App) et de validation (Val) pour l'évaluation génétique assistée par marqueurs

Race	Androsténone		Scatol	
	App	Val	App	Val
Duroc	471	115	451	115
Landrace	574	143	544	130
Yorkshire	581	160	554	137

2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2.1. Composés à l'origine des odeurs sexuelles

Le tableau 2 présente les statistiques descriptives concernant l'androsténone et le scatol dans les trois races étudiées. La figure 1 montre la distribution conjointe des deux composés dans chacune des races, en échelle log. Les seuils de tolérance par les consommateurs de 1000 ng/g pour l'androsténone et 200 ng/g pour le scatol dans les tissus gras sont basés sur les résultats de Walstra *et al.* (1999). Environ la moitié des mâles entiers Duroc et un quart des mâles entiers Landrace et Yorkshire avaient un niveau d'androsténone supérieur au seuil de tolérance. Environ 95% des mâles entiers Duroc avaient un niveau de scatol inférieur au seuil de tolérance. Les niveaux de scatol étaient plus élevés dans les races Landrace et Yorkshire (Tableau 2).

Tableau 2 – Description des taux d'androsténone et de scatol pour les mâles entiers inclus dans les analyses

	Race		
	Duroc	Landrace	Yorkshire
Androsténone, ng/g			
N	588	723	741
Moyenne	1 467	931	841
Ecart-type	1 567	1 116	875
Minimum	35	65	75
Maximum	10 419	13 748	7 747
% >1000 ng/g	47	28	25
Scatol, ng/g			
N	568	680	691
Moyenne	71	127	94
Ecart-type	129	216	170
Minimum	0	0	0
Maximum	1 986	3 062	3 503
% >200 ng/g	5	14	10

Toutes races confondues, environ 5% des mâles entiers testés dans le projet se situaient au-dessus du seuil de tolérance à la fois pour l'androsténone et le scatol, 28% étaient trop élevés pour l'androsténone mais acceptables pour le scatol, 6% étaient trop élevés pour le scatol mais acceptables pour l'androsténone, et 62% étaient acceptables pour les deux composés à l'origine des odeurs.

2.2. Fréquences alléliques

Pour pouvoir sélectionner contre les odeurs de verrat, des marqueurs polymorphes associés aux composés chimiques sont nécessaires. Sur les 124 marqueurs du panel initial, 97 SNP ont été conservés pour les analyses ultérieures. Après avoir éliminé les SNP ayant une fréquence d'allèle mineur intra-race inférieure à 5%, il restait 61, 80 et 83 SNP en ségrégation, respectivement, dans les races Duroc, Landrace et Yorkshire. La figure 2 montre les différences entre races en termes de fréquences alléliques pour les différents marqueurs. La fréquence de l'allèle mineur vaut en moyenne 17% en race Duroc, 21% en race Landrace et 23% en race Yorkshire sur les 97 SNP étudiés.

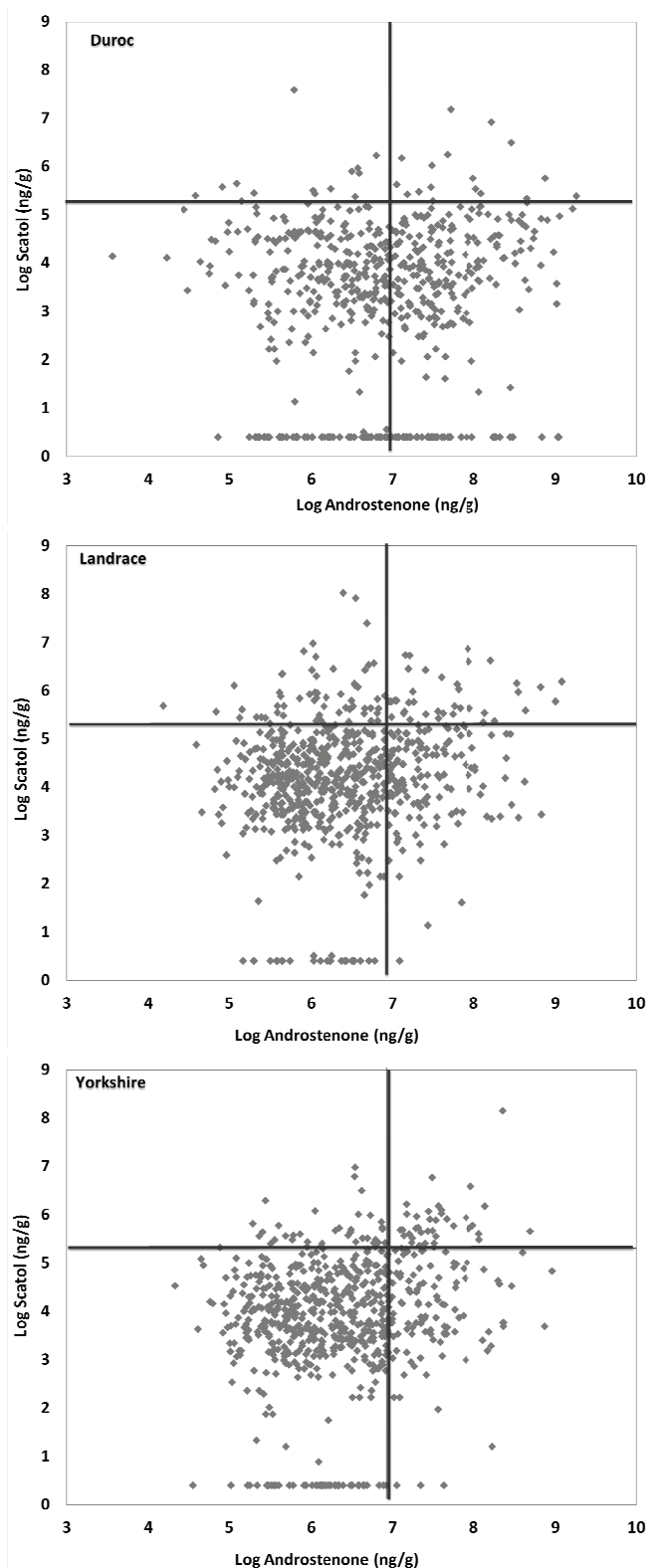


Figure 1 - Distribution conjointe des taux d'androsténone et de scatol chez les mâles entiers des trois races testées (échelle log)

Les lignes verticales et horizontales symbolisent les seuils de tolérance (en échelle log) des consommateurs, respectivement pour l'androsténone et le scatol.

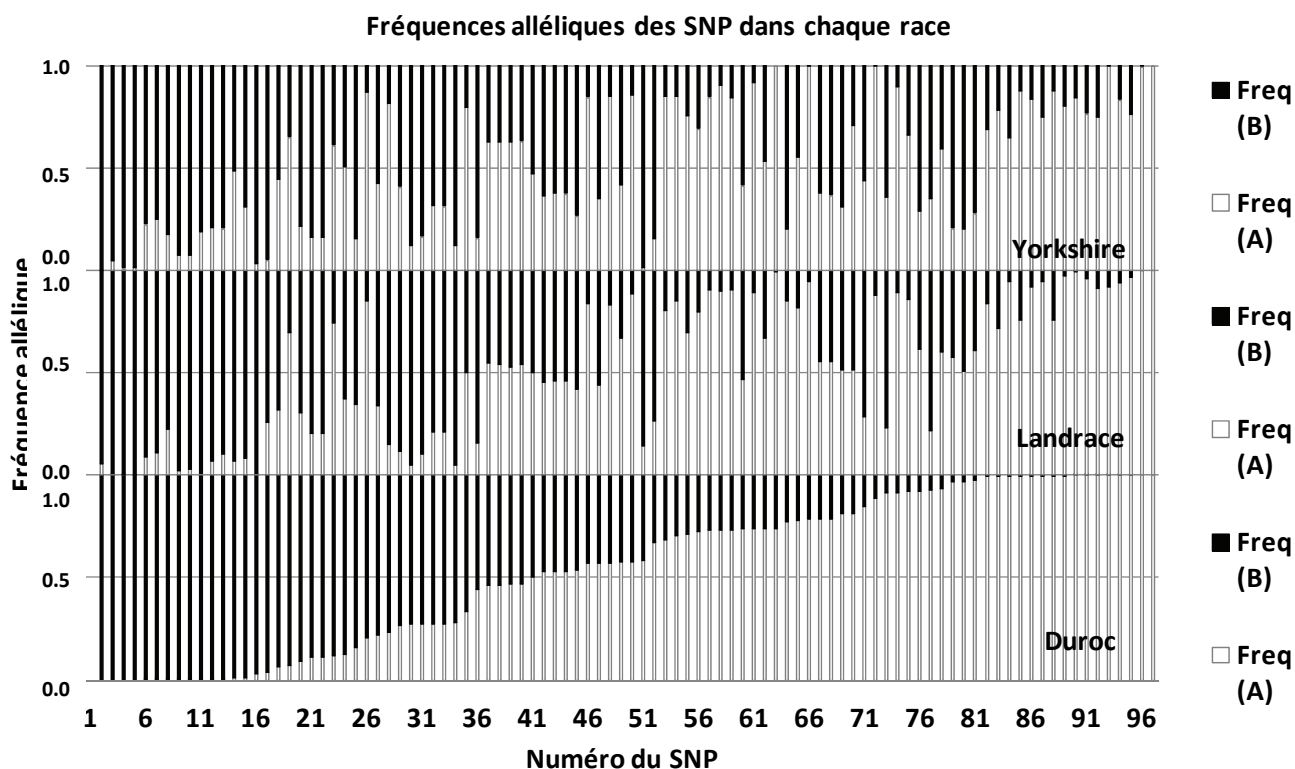


Figure 2 - Fréquences alléliques des 97 marqueurs SNP testés dans chaque race, les marqueurs étant classés sur la base de la fréquence d'allèle mineur dans la race Duroc

2.3. Effets des marqueurs

Les meilleurs modèles incluait respectivement 14, 23 et 12 SNP en race Duroc (androsténone), Landrace (scatol) et Yorkshire (scatol), respectivement, avec un R^2 de 22, 14 et 14%. Le nombre d'allèles SNP défavorables (associés à des taux plus élevés de scatol et/ou d'androsténone) ayant un effet significatif sur les odeurs de verrat a été utilisé pour grouper les mâles entiers. Les taux d'androsténone et de scatol en fonction du nombre d'allèles défavorables sont présentés pour deux races dans les figures 4 et 5. Chez les Duroc, le nombre d'allèles défavorables est corrélé significativement ($r = 0,33$, $P < 0,001$) avec le taux d'androstérone du gras (Figure 3). Le nombre d'allèles défavorables est corrélé significativement ($r = 0,23$, $P < 0,01$) avec le niveau de scatol en race Landrace (Figure 4). Aucune corrélation significative n'a été observée entre le nombre d'allèles défavorables et le niveau de scatol en race Yorksire. Ceci pourrait être dû à la proportion relativement faible d'animaux Yorkshire présentant un taux élevé de scatol. Le sous-groupe de marqueurs génétiques spécifiques à chaque composé chimique pourrait être utilisé dans les évaluations génétiques nationales pour calculer des valeurs génétiques assistées par marqueurs (VGM) susceptibles d'être intégrées dans les indices de sélection afin de diminuer les niveaux d'androsténone et de scatol chez les animaux de race pure. Les résultats de cette étude sont prometteurs quant à la pertinence des marqueurs testés.

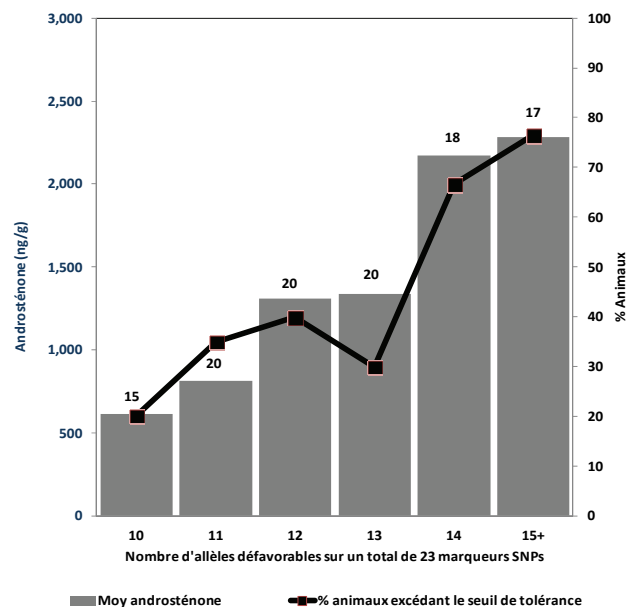


Figure 3 - Relation entre le nombre d'allèles défavorables et les niveaux d'androsténone dans le groupe de validation Duroc. Le nombre d'animaux dans chaque groupe est indiqué au-dessus de chaque barre. Le groupe 15+ comprend 9, 6 et 2 animaux avec chacun 15, 16 et 17 allèles défavorables, respectivement.

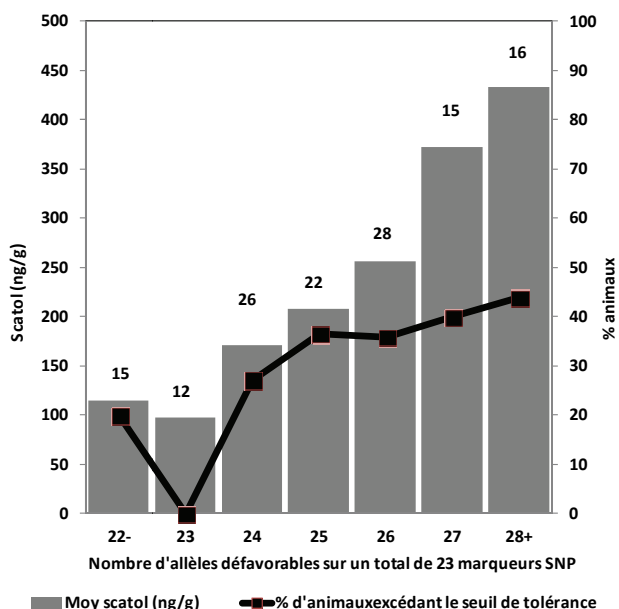


Figure 4 - Relation entre le nombre d'allèles défavorables et les niveaux de scatol dans le groupe de validation Landrace
 Le nombre d'animaux dans chaque groupe est indiqué au-dessus de chaque barre. Le groupe 22- comprend 4 et 11 animaux avec chacun 21 et 22 allèles défavorables, respectivement. Le groupe 28+ inclut 10, 4 et 2 animaux avec chacun 28, 29 et 30 allèles défavorables, respectivement.

2.4. Valeurs génétiques assistées par marqueurs

Les corrélations entre les VGM et les phénotypes ajustés pour l'androsténone dans le groupe de validation étaient de 0,35, 0,26 et 0,40, respectivement, pour les races Duroc, Landrace et Yorkshire. La même procédure appliquée au scatol donne des corrélations plus faibles : 0,05, 0,25 et -0,05 respectivement, pour le Duroc, Landrace et le Yorkshire (Tableau 3). Les corrélations observées indiquent que la sélection assistée par marqueurs contre les odeurs sexuelles pourrait être améliorée, par exemple avec des modèles plus sophistiqués ou en utilisant des valeurs génétiques BLUP plutôt que des phénotypes ajustés comme données initiales dans la procédure de prédiction. Les corrélations plus faibles obtenues entre les VGM et les phénotypes dans le cas du scatol pour les races Duroc et Yorkshire pourraient être dues à la variabilité plus faible de ce caractère dans ces deux races par rapport au Landrace. Avec davantage d'animaux dans le groupe d'estimation, on pourrait également augmenter la précision des VGM.

Tableau 3 – Corrélations, dans le groupe de validation, entre les phénotypes ajustés pour le taux d'androsténone et de scatol et les valeurs génétiques assistées par marqueur pour l'androsténone et le scatol

Race	Androsténone	Scatol
Duroc	0,35	0,05
Landrace	0,26	0,26
Yorkshire	0,40	-0,05

3. PERSPECTIVES : VALIDATION DES RÉSULTATS DANS DES TESTS COMMERCIAUX

Ces résultats préliminaires dans les races pures canadiennes sont très prometteurs et doivent être validés dans des conditions commerciales.

Les producteurs canadiens pourraient-ils d'ores et déjà bénéficier de valeurs génomiques sur les odeurs sexuelles estimées pour les verrats terminaux disponibles dans les centres d'insémination artificielle (CIA) ? Une étude complémentaire est en cours pour explorer les moyens d'action permettant de contrôler les odeurs sexuelles telles que la génomique, l'alimentation et les techniques d'élevage. Les verrats Duroc disponibles dans les CIA canadiens ont été échantillonnés et génotypés avec le panel de marqueurs spécifiques aux odeurs sexuelles. Un groupe de 1000 porcs commerciaux seront produits en utilisant de la semence de verrats choisis sur la base de leurs valeurs génomiques pour l'androsténone et le scatol décrites dans cet article. Les 1000 porcs testés incluront des femelles, des castrats, des mâles entiers et des mâles immunocastrés issus de verrats avec des valeurs génomiques très faibles ou très élevées pour l'androsténone et le scatol (Figure 6). Ces animaux seront testés en station, suivis en abattoir individuellement pour une évaluation exhaustive de la qualité de la carcasse et de la viande et un test de nez humain. Puis une partie des longes seront prélevées pour faire l'objet d'analyses sensorielles. Dans le même projet, de nouvelles méthodes de détection des odeurs dans les tissus gras seront explorées, telles que les aptamères ADN spécifiques pour l'androsténone et le scatol. Il s'agit de molécules d'ADN de synthèse, sélectionnées pour leur affinité spécifique avec les molécules ciblées dans ce projet.

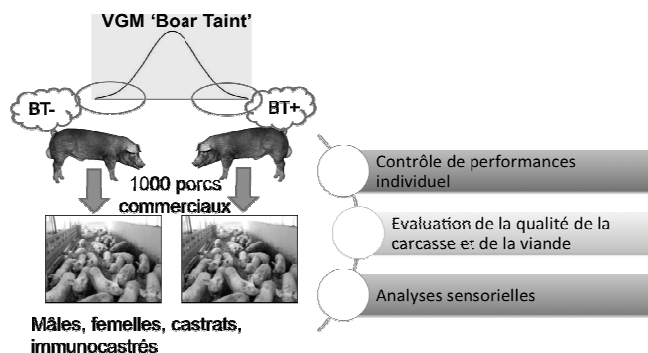


Figure 6 - Structure des tests commerciaux pour la validation des marqueurs pour les odeurs sexuelles

CONCLUSION

Les résultats de cette étude préliminaire montrent le potentiel d'utilisation des marqueurs génétiques pour diminuer le niveau des odeurs de verrot chez les porcs canadiens de race pure. Les analyses décrites ici donnent de meilleurs résultats concernant l'association des marqueurs avec l'androsténone comparativement au scatol. Les valeurs génétiques calculées sur la base des marqueurs constituent un outil de prédiction prometteur, qui pourrait être utilisé sur des animaux très jeunes à partir d'un simple échantillon d'ADN. D'autres méthodes d'évaluation génétique ou génomique devraient être explorées à l'avenir, et il paraît essentiel d'augmenter la taille des groupes d'apprentissage dans toutes les races. Il est également nécessaire de valider ces résultats dans un contexte commercial, sur des animaux croisés. Des analyses sont en cours dans cet objectif.

REMERCIEMENTS

Le financement de ce projet a été fourni par le Conseil d'adaptation agricole de l'Ontario qui gère le programme

canadien d'adaptation agricole pour Agriculture et agro-alimentaire Canada. Le soutien financier provenait également des centres régionaux d'amélioration génétique porcine dans les différentes provinces canadiennes et des éleveurs de porcs canadiens participants.

Un nouveau projet, financé par le programme Agri-Innovation d'Agriculture et agro-alimentaire Canada, permet de poursuivre les activités dans ce domaine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Baes C., Mattei S., Luther H., Ampuero S., Sidler X., Bee G., Spring P., Hofer A., 2013. A performance test for boar taint compounds in live boars. *Animal*, 7, 714-720.
- Lanthier F., Lou Y., Squires E.J., 2007. Skatole metabolism in the intact pre-pubescent male pig: The relationship between hepatic enzyme activity and skatole concentrations in plasma and fat. *Livest. Sci.*, 106, 145-153.
- Sargolzaei M., Schenkel F.S., VanRaden P.M., 2009. *gebv*: Genomic breeding value estimator for livestock. DCBGC Meeting, October 7, University of Guelph, Guelph, ON, Canada (<http://cgil.uoguelph.ca/dcbgc/Agenda0910/GEBV.pdf>)
- Squires E.J., Lundstrom K., 1997. Relationship between cytochrome P45011E1 in liver and levels of skatole and its metabolites in intact male pigs. *J. Anim. Sci.*, 75, 2506-2511.
- VanRaden P.M., Van Tassell C.P., Wiggans G.R., Sonstegard T.S., Schnabel R.D., Taylor J.F., Schenkel F.S., 2009. Invited review: reliability of genomic predictions for North American Holstein bulls. *J. Dairy Sci.*, 92, 16-24.
- Walstra P., Claudi-Magnussen C., Chevillon P., von Seth G., Diestre A., Matthews K.R., Homer D.B., Bonneau M., 1999. An international study on the importance of androstenone and skatole for boar taint: levels of androstenone and skatole by country and season. *Livest. Prod. Sci.*, 62, 15-28.
- Zamaratskaia G., Squires E.J., 2009. Biochemical, nutritional and genetic effects on boar taint in entire male pigs. *Animal*, 3, 1508-1521.