



HAL
open science

Déterminisme génétique de la teneur en androsténone et en scatol dans une population de porc Large White

Catherine Larzul, Nathalie Iannuccelli, Yvon Billon, Joan Tibau, Jean Pierre Bidanel

► To cite this version:

Catherine Larzul, Nathalie Iannuccelli, Yvon Billon, Joan Tibau, Jean Pierre Bidanel. Déterminisme génétique de la teneur en androsténone et en scatol dans une population de porc Large White. 42. Journées de la Recherche Porcine, Feb 2010, Paris, France. hal-01193593

HAL Id: hal-01193593

<https://hal.science/hal-01193593>

Submitted on 3 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Déterminisme génétique des teneurs en androsténone et en scatol du tissu gras dans une population de porcs Large White

Catherine LARZUL (1), Nathalie IANNUCELLI (2), Yvon BILLON (3), Joan TIBAU (4), Jean-Pierre BIDANEL (1)

(1)INRA, UMR1313, Génétique Animale et Biologie Intégrative, Domaine de Vilvert, F-78350 Jouy-en-Josas, France

(2) INRA, UMR444, Laboratoire de Génétique Cellulaire, F-31326 Castanet-Tolosan, France

(3) INRA UE967 GEPA, F-17700 Surgères, France

(4) IRTA-Monells, Veïnat de Sies, E-17121 Monells, Espagne

catherine.larzul@jouy.inra.fr

Déterminisme génétique des teneurs en androsténone et en scatol du tissu gras dans une population de porcs Large White

La sélection est l'une des voies pour résoudre le problème des teneurs en androsténone et en scatol, responsables de l'odeur de verrat chez les mâles entiers. Afin de compléter la connaissance du déterminisme génétique de ces caractères, une estimation des paramètres génétiques, en relation avec les caractères de croissance, d'engraissement et de qualité technologique de la viande a été réalisée dans une population de 513 porcs de race Large White. Globalement, les teneurs en scatol sont faibles. Pour 35% des animaux abattus à environ 110 kg, les teneurs en androsténone dépassent la limite au-delà de laquelle un défaut d'odeur peut être perçu par le consommateur. Les héritabilités pour les deux teneurs sont moyennes (0,33 et 0,29 pour la teneur en androsténone et en scatol, respectivement). Les corrélations génétiques avec la vitesse de croissance sont faibles ou défavorables. En revanche, les corrélations génétiques avec la teneur en muscle des pièces et la qualité de la viande sont favorables. Pour l'étude d'association pangénomique avec un jeu de marqueurs de 64232 SNP, plusieurs zones du génome sont significativement associées aux teneurs en ces deux composés, mais il reste de nombreuses voies à explorer, d'une part pour déterminer les marqueurs significativement associés aux teneurs en androsténone et en scatol, d'autre part pour préciser les zones d'intérêt sur le génome.

Genetic determination of androstenone and skatole levels of adipose tissue in a French Large White pig population

Selection would help to solve the problem of the levels of androstenone and skatole, responsible for boar taint in entire male pigs. To complement the knowledge of the genetic determination of these traits, estimation of genetic parameters in relation to growth traits, fattening traits and technological quality of meat was conducted in a population of 513 French Large White pigs. Overall, skatole levels are low. For 35% of the animals at a slaughter weight of 110 kg, the levels of androstenone exceed the limit beyond which boar taint can be perceived by the consumer. The heritability values estimated for the two compounds are of medium range (0.33 and 0.29 for the content of androstenone and skatole, respectively). The genetic correlations with growth rate are weak or unfavourable. In contrast, genetic correlations with the lean meat content and meat quality traits are favourable. For the genome-wide association study with a set of 64,232 SNP markers, several areas of the genome are significantly associated with the two traits, but there are still many studies to carry out to unmistakably identify markers significantly associated with the androstenone and skatole contents, and to clarify the loci of interest.

INTRODUCTION

Les porcs mâles sont castrés pour prévenir l'apparition d'un défaut d'odeur de la viande (odeur sexuelle). Ce défaut est dû à la présence de scatol (résidu produit par une bactérie du tube digestif) et/ou d'androsténone (stéroïde produit par les testicules) qui sont détectés dans la carcasse à des niveaux plus élevés chez les mâles entiers que chez les mâles castrés ou les femelles. Au niveau européen, quelques pays ont déjà interdit ou sont en train d'interdire la castration des porcelets sans anesthésie. Les alternatives proposées (castration avec anesthésie, castration chimique, sexage de la semence, tri des carcasses en ligne) sont en cours d'étude pour estimer leur faisabilité. En plus des propositions mentionnées précédemment, une des alternatives est l'abandon de la castration pour élever des mâles entiers. La mise en place de ce système nécessite toutefois de réduire l'incidence des odeurs sexuelles chez ces animaux.

Il a déjà été montré qu'il était possible de réduire la teneur en androsténone du gras de bardière par sélection. L'étude du déterminisme génétique des teneurs en androsténone et en scatol a montré des valeurs d'héritabilité moyennes à élevées, avec une corrélation génétique positive entre les deux teneurs. Cependant, jusqu'à présent, la voie génétique n'a pas été retenue pour diminuer l'incidence du défaut d'odeur sexuelle. L'une des raisons principales est le lien qui existe entre teneur en androsténone et maturité sexuelle, que ce soit chez le mâle ou chez la femelle (Zamaratskaia et Squires, 2009). Il faut d'une part considérer que la mesure à poids fixe, autour de la maturité sexuelle des animaux peut traduire deux dynamiques d'accumulation de l'androsténone dans les tissus. Une teneur faible en androsténone peut correspondre à un individu qui accumule faiblement l'androsténone dans les tissus adipeux ou à un individu qui a une maturité sexuelle retardée. Ne considérer la teneur en androsténone qu'au moment de l'abattage, qui est le caractère d'intérêt, sans en connaître la dynamique ultérieure représente un risque certain pour la précocité sexuelle. Une autre raison est la difficulté d'obtenir une information sur les mâles entiers, puisque seuls les candidats à la sélection, non castrés et non retenus, peuvent être mesurés.

Pour pallier ces deux difficultés, l'utilisation des outils moléculaires est donc très attendue. Plusieurs études ont mis en évidence des QTL ayant un effet soit sur le niveau d'androsténone soit sur le niveau de scatol dans plusieurs régions du génome et quelques gènes candidats ont été étudiés. Le plus prometteur est un gène situé sur le chromosome 14 (CYP2E1) dont le polymorphisme est associé à la teneur en scatol (Karacaören et al., 2009). Toutefois, les localisations des QTL sont jusqu'à présent restées très approximatives. Des études complémentaires ont été menées pour rechercher du polymorphisme dans des gènes candidats, qui pourraient expliquer une part de variabilité de ces caractères, mais les résultats sont inconsistants d'une étude à l'autre et n'ont jamais permis de mettre en évidence des mutations causales qui permettraient de réaliser une sélection efficace.

La dernière révolution en cours est celle du séquençage du génome porcine qui mettra à disposition de nouveaux outils moléculaires dont les attendus sont la précision améliorée de la localisation des QTL, la découverte de nouveaux QTL, voire la mise en évidence des mutations causales. L'un des buts est de pouvoir cibler les zones du génome ayant un effet sur la

teneur en androsténone et en scatol sans avoir d'effet défavorable sur les autres caractères d'intérêt, notamment la reproduction. Il existe dorénavant un jeu de marqueurs dense qui couvre l'ensemble du génome. Il s'agit de marqueurs SNP (polymorphisme d'un simple nucléotide), identifiés par une mutation. Ces marqueurs ont deux allèles et sont extrêmement nombreux. Un sous-ensemble de ces marqueurs a été validé et est disponible sous la forme d'une « puce SNP » qui permet de génotyper plus de 60 000 marqueurs par individu.

Le but de la présente étude est de préciser le déterminisme génétique des teneurs en androsténone et en scatol dans une population de porcs Large White à travers l'estimation des paramètres génétiques et la recherche de QTL à l'aide de marqueurs SNP denses.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. Animaux

Le troupeau femelle LW support pour cette étude est celui du domaine expérimental INRA du Magneraud. Les mâles utilisés pour inséminer ces femelles sont issus de la population des verrats actifs présents dans les centres d'insémination artificielle et ont été choisis comme les moins apparentés possibles. En moyenne, au moment du choix, le coefficient de parenté des verrats était de 0,02, compris entre 0,005 et 0,07. Au total, 56 verrats ont été utilisés pour inséminer 98 truies. Les porcelets mâles, entre 1 et 9 par portée, n'ont pas été castrés. Après le sevrage, les animaux ont été élevés en loge collective et contrôlés jusqu'à l'abattage à un poids vif de 111 ± 8 kg.

1.2. Mesures

Le gain moyen quotidien a été estimé entre 25 kg et 110 kg.

Le jour de l'abattage, le poids de la carcasse a été enregistré pour estimer le rendement à l'abattage. De plus, la TMP (teneur en maigre des pièces) a été estimée à partir des mesures FOM.

Le lendemain de l'abattage, les mesures suivantes de qualité de la viande ont été réalisées :

- mesure à la fente sur la demi-carcasse de l'épaisseur de lard dorsal au niveau des reins, du dos et du cou ;
- pH 24 heures mesuré sur les muscles adducteur, demi-membraneux, long dorsal (au niveau de la dernière côte) et fessier superficiel ;
- mesure des paramètres de couleur L*, a* et b* sur les muscles fessier superficiel et fessier moyen.

Un prélèvement de bardière a été réalisé au niveau du cou, ensaché sous vide et congelé à -20°C , pour quantification ultérieure des teneurs en scatol, par HPLC, et en androsténone, par la méthode GC-MS (Sole et Garcia Regueiro, 2001). Les teneurs sont exprimées en $\mu\text{g/g}$ de tissu adipeux frais.

Au total, 513 porcelets mâles non castrés ont été engraisés et abattus, parmi lesquels 480 ont été mesurés pour la teneur en androsténone et 373 pour la teneur en scatol.

1.3. Marqueurs

Un prélèvement de sang a été réalisé sur les verrats et les truies pour extraction d'ADN. Pour les porcelets, l'ADN a été extrait à partir d'un échantillon de queue. L'ADN a été envoyé

au Centre National de Génotypage pour un génotypage réalisé sur une puce Illumina de 64 232 marqueurs SNP.

1.4. Analyses statistiques

Pour les analyses, compte tenu de leurs distributions, les teneurs en androsténone et en scatol ont préalablement fait l'objet d'une transformation logarithmique.

Pour l'estimation des paramètres génétiques de la teneur en scatol, de la teneur en androsténone, et des caractères de qualité de la viande, les effets retenus étaient la date d'abattage en effet fixe et le poids en fin d'engraissement en covariable. Pour le gain moyen quotidien, les effets retenus étaient le poids en début d'engraissement en covariable et la bande en effet fixe (8 niveaux). Enfin, pour les caractères de carcasse (rendement, TMP et épaisseur de lard), les effets retenus étaient le poids en fin d'engraissement en covariable et la bande en effet fixe. Pour tous les caractères, les effets aléatoires étaient la portée de naissance et l'effet génétique additif. Les corrélations génétiques ont été estimées entre les teneurs en androsténone et en scatol par groupe de 3 ou 4 caractères. Les calculs ont été réalisés à l'aide du logiciel VCE6 (Neumaier et Groeneveld, 1998).

Pour les analyses d'association entre les teneurs en androsténone et en scatol et les marqueurs SNP, les données ont été préalablement corrigées pour le poids en fin d'engraissement et la date d'abattage. Les marqueurs (sauf 8805) ont été positionnés sur la séquence porcine (septembre 2009). Les marqueurs dont la fréquence de l'allèle minoritaire était inférieure à 5% n'ont pas été pris en compte dans l'analyse. Au total, 49 148 marqueurs ont pu être testés. Les calculs ont été réalisés avec le logiciel PLINK (Purcell et al., 2007), en tenant compte de la structure familiale. Les valeurs des statistiques de test ont été obtenues de manière empirique par permutation (nombre de permutations = 1000).

2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les teneurs en androsténone et en scatol (Figure 1) mesurées sur cette population sont relativement faibles.

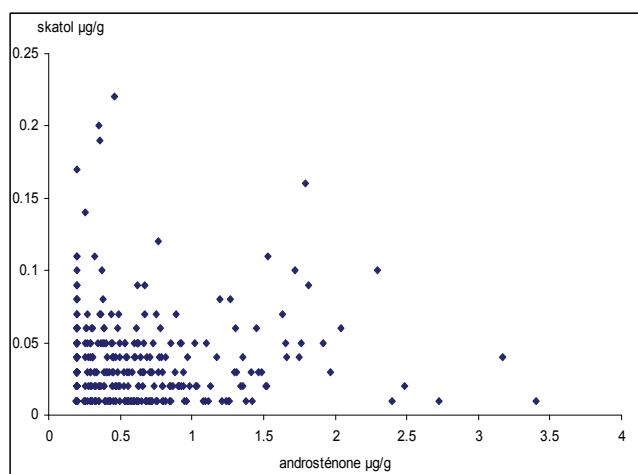


Figure 1 : Teneurs en androsténone et en scatol de la bardière

Les teneurs en scatol (sauf une) sont inférieures à la limite de 0,2 µg/g, généralement présentée comme la limite au-delà de laquelle ce composé est perçu par le consommateur. Pour l'androsténone, la limite au-delà de laquelle elle est perçue comme un problème est de 1µg/g. Pour cette population, cela

correspond à 13,8% des observations. Cependant, la teneur étant rapportée au tissu gras frais et non au tissu gras pur, il faut appliquer un facteur correctif et le seuil de 1µg/g correspond à une valeur de 0,59 µg/g. La fréquence des observations supérieures à cette valeur est de 35%. La valeur maximale observée pour la teneur en androsténone est de 3,4µg/g. Harlizius et al. (2008) ont présenté des résultats observés dans une lignée synthétique Duroc avec des teneurs en androsténone supérieures à 10 µg/g pour une moyenne estimée à 1,7µg/g, soit largement au-dessus de la moyenne de la population LW (0,57 µg/g, Tableau 1). La corrélation phénotypique entre les teneurs en scatol et en androsténone est faible (0,17). Cette relation positive est conforme à la littérature.

Tableau 1 : Paramètres génétiques des teneurs en androsténone et en scatol

	Androsténone	Scatol
Moyenne valeurs non transformées (µg/g)	0,57	0,03
Ecart type (µg/g)	0,49	0,03
h ²	0,33	0,29
c ²	0,21	0,18

h² : héritabilité ; c² : effet d'environnement commun (portée)

Héritabilités

L'héritabilité estimée pour la teneur en androsténone est inférieure aux valeurs généralement rapportées dans la littérature, soit autour de 0,6 (Robic et al., 2008 ; Harlizius et al., 2008). La teneur en scatol a généralement une valeur d'héritabilité inférieure à celle de l'androsténone, autour de 0,3 (Robic et al., 2008 ; Harlizius et al., 2008).

La corrélation génétique entre la teneur en androsténone et la teneur en scatol est fortement négative (-0,48), contrairement aux estimations positives récemment présentées dans la littérature (Tajet et al., 2006 ; Harlizius et al., 2008).

L'effet 'portée' est important, estimé à 0,2 pour les deux caractères. Dans certaines études publiées antérieurement, il n'a pas pu être estimé en raison du faible nombre d'animaux mesurés par portée.

Cependant, les estimations réalisées dans d'autres études ont conduit à des effets 'portée' faibles, inférieurs à 5%. Le dispositif ne semble pas être la cause de cette valeur élevée puisque pour les caractères tels que le gain moyen quotidien ou l'épaisseur de lard dorsal, ces valeurs sont inférieures à 5%, comme attendu. Une explication possible est la présence d'effets non additifs qui seraient confondus avec l'effet portée dans ce dispositif. Une autre explication est la distribution particulière des teneurs en androsténone et en scatol, avec une proportion importante d'échantillons ayant une teneur égale au seuil de détection.

Corrélations phénotypiques et génétiques

Les corrélations phénotypiques et génétiques entre les teneurs en androsténone ou scatol et les caractères de croissance, de composition de la carcasse et de qualité de la viande sont présentées dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Corrélations phénotypiques et génétiques entre les teneurs en androsténone ou scatol et les caractères de croissance, de composition de la carcasse et de qualité de la viande.

	Corrélations phénotypiques		Corrélations génétiques	
	androsténone	scatol	androsténone	scatol
Gain moyen quotidien	0,15	-0,18	0,64	-0,04
Rendement	0,03	-0,04	0,55	0,36
TMP	-0,18	0,05	-0,60	0,14
Épaisseur de lard dorsal	0,06	0,02	0,22	0,30
pH 24h				
Long dorsal	-0,01	-0,02	-0,06	-0,47
Demimembraneux	-0,08	-0,03	0,38	0,35
Adducteur	-0,05	-0,03	0,26	-0,19
Fessier superficiel	-0,02	-0,09	0,52	-0,26
L*				
Fessier moyen	-0,07	-0,05	-0,56	-0,36
Fessier superficiel	-0,04	0,04	-0,14	-0,52
a*				
Fessier moyen	0,05	-0,01	-0,26	-0,36
Fessier superficiel	0,04	0,03	0,64	-0,02
b*				
Fessier moyen	-0,04	-0,04	-0,62	-0,22
Fessier superficiel	0,01	0,04	0,69	-0,85

Que ce soit pour la teneur en androsténone ou pour la teneur en scatol, les corrélations phénotypiques avec les autres caractères sont peu élevées, comprises entre -0,18 et 0,15. La valeur de -0,18 a été relevée pour la corrélation entre la teneur en androsténone et la TMP ainsi qu'entre la teneur en scatol et le gain moyen quotidien. La corrélation phénotypique de 0,15 concerne la teneur en androsténone et le gain moyen quotidien. Les corrélations génétiques sont moyennes à élevées pour plusieurs caractères. Ces estimations manquent cependant de précision (erreur standard supérieure à 0,3) compte tenu du faible nombre d'individus mesurés dans cette étude. Il faut noter des corrélations plutôt défavorables entre la teneur en androsténone et les caractères d'intérêt tel que le gain moyen quotidien ou le rendement de carcasse. Les corrélations génétiques montrent en effet qu'une sélection contre la teneur en androsténone conduirait à une diminution du gain moyen quotidien et du rendement de carcasse. Les corrélations génétiques avec la teneur en maigre et l'adiposité sont plutôt favorables, la diminution de la teneur en androsténone conduisant à une augmentation de la TMP et à une diminution de l'épaisseur de lard dorsal, même s'il est admis que les corrélations génétiques entre teneur en androsténone et gain moyen quotidien ou adiposité sont faibles, voire nulles (Sellier et al., 2000). Les corrélations génétiques avec les pH ultime sont positives, à l'exception de celle concernant le pH ultime du muscle long dorsal.

La corrélation génétique entre le gain moyen quotidien ou la TMP et la teneur en scatol sont faibles alors que les corrélations avec le rendement ou l'épaisseur de lard sont modérées. Une sélection contre le scatol n'aurait que peu

d'incidence sur le gain moyen quotidien ou la TMP mais conduirait à une diminution du rendement et de l'épaisseur de lard dorsal et à une augmentation du pH ultime dans le muscle long dorsal. La corrélation entre scatol et pH_u du SM est opposée aux corrélations entre scatol et pH_u des autres muscles, en particulier le LD. Il faudrait valider ce résultat sur un plus grand nombre de données.

Il n'existe pas de corrélations génétiques publiées entre les teneurs en scatol ou androsténone et les caractères de qualité de la viande tels que le pH ou la couleur.

Associations avec des marqueurs

Dans la présente étude, les 71 marqueurs les plus significatifs sont positionnés sur les chromosomes 1, 2, 6, 7, 9, 13, 14 et 16.

Plusieurs études de recherche de QTL ont mis en évidence des locus ayant un effet quantitatif significatif sur la teneur en androsténone ou la teneur en scatol : voir la revue de Robic et al. (2008). Les chromosomes mentionnés étaient nombreux, mais les QTL les plus significatifs ont été localisés sur les chromosomes 2, 3, 4, 6, 7, 9, 13 et 14. Une première étude impliquant un nombre important de SNP (environ 7000) n'a pas permis de mettre en évidence d'autres locus ayant un effet sur la teneur en androsténone ou en scatol, hormis sur le chromosome 14, au niveau du gène CYP2E1, pour la teneur en scatol.

Les premiers résultats d'une étude d'association pangénomique utilisant le même jeu de marqueurs SNP dense a montré plusieurs associations significatives avec la teneur en scatol et dans une moindre mesure, compte tenu du dispositif expérimental, avec la teneur en androsténone (Harlizius et al., 2009). Compte tenu de l'état incomplet de la séquence du génome porcine, il est encore difficile de présenter avec certitude la position des QTL, une partie des marqueurs étant encore mal positionnés. Les résultats de cette étude doivent d'ailleurs être considérés avec les mêmes précautions, même si la séquence et donc le positionnement des marqueurs sont de mieux en mieux connus.

Les résultats obtenus, encore très frustes, nous apportent de nouvelles pistes pour explorer le génome. L'étude réalisée jusqu'à présent n'a pas permis d'estimer l'effet associé à chacun des marqueurs. Cependant, en considérant la densité de marqueurs significatifs dans certaines régions, les zones les plus intéressantes à explorer semblent être situées sur les chromosomes 1 et 14. Mais ces résultats doivent d'abord être confrontés à des dispositifs plus ou moins similaires actuellement en cours d'analyse dans plusieurs populations européennes de porcs.

CONCLUSION

Cette étude a permis de mesurer les teneurs en androsténone et en scatol du tissu adipeux dans la population Large White français.

En effet, il existe peu de données publiées récemment mentionnant ces teneurs dans cette population. Le choix d'un grand nombre de verrats présents dans les CIA donne une bonne représentation de la population actuelle. Il conviendrait de réaliser des sondages similaires dans les autres populations en sélection, ainsi que dans les populations d'animaux croisés. Il ressort que le Large White a des teneurs en androsténone et

en scatol peu élevées comparés à d'autres races. Les paramètres génétiques estimés ont permis de préciser la relation entre les teneurs en androsténone ou scatol et les caractères d'intérêt tels que la vitesse de croissance, l'adiposité de la carcasse et la qualité de la viande.

Pour l'étude d'association avec des marqueurs génétiques, il reste de nombreuses voies à explorer, d'une part pour déterminer les marqueurs significativement associés aux teneurs en androsténone et en scatol, d'autre part pour préciser les zones d'intérêt dans le génome.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été cofinancée par le programme européen SABRE (6^{ème} PCRD). Les auteurs remercient chaleureusement le personnel technique de l'unité expérimentale INRA GEPA, et de l'IRTA pour l'élevage des animaux, la collecte des échantillons, l'extraction d'ADN, et la réalisation de l'ensemble des mesures. Les auteurs remercient également le Centre National de Génotypage pour la réalisation des génotypes. Ils remercient enfin SIGENAE pour la mise à disposition des données de génotypage.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Harlizius B., Bendixen C., Larzul C., Tibau J., 2008. An integrated genomics approach to unravel the genetic basis of variability in boar taint. 59th EAAP meeting, 23-26 août 2008, Vilnius, Lituanie.
- Harlizius B., Duijvesteijn N., Knol E.F., 2009. High-density genome association study for androstenone in a terminal sire line. 60th EEAP meeting, 24-27 août 2009, Barcelone, Espagne.
- Karacaören B., de Koning D.J., Velander I., Haley C., Archibald A., 2009. Genome-wide association analyses for loci controlling boar taint. 60th EEAP meeting, 24-27 août 2009, Barcelone, Espagne.
- Neumaier, A., Groeneveld E., 1998. Restricted maximum likelihood estimation of covariances in sparse linear models. *Genet. Sel. Evol.*, 30, 3-26.
- Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M.A., Bender D., Maller J., Sklar P., de Bakker P.I.W., Daly M.J., Sham P.C., 2007. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.*, 81, 559-575.
- Robic A., Larzul C., Bonneau M., 2008. Genetic and metabolic aspects of androstenone and skatole deposition in pig adipose tissue: a review. *Genet. Sel. Evol.*, 40, 129-143.
- Sellier P., Le Roy P., Fouilloux M.N., Gruand J., Bonneau M. 2000. Responses to restricted index selection and genetic parameters for fat androstenone level and sexual maturity status of young boars. *Livest. Prod. Sci.*, 63, 265-274.
- Sole M.A., Garcia Regueiro J.A., 2001. Role of 4-phenyl-3-buten-2-one in boar taint: Identification of new compounds related to sensorial descriptors in pig fat. *J. Agric. Food Chem.*, 11, 5303-5309.
- Tajet H., Andresen O., Meuwissen T.H.E., 2006. Estimation of genetic parameters for boar taint: skatole and androstenone and their correlations with sexual maturation. *Acta Vet. Scand.*, 48 (Suppl. 1), S9, 22-23.
- Zamaratskaia G., Squires E.J., 2009. Biochemical, nutritional and genetic effects on boar taint in entire male pigs. *Animal*, 3, 1508-1521.

