



# Le métabolome, un moyen pour trouver de nouveaux biomarqueurs ?

**Des profils métabolomiques pour faire de la prédiction de phénotypes chez le porc en croissance**

**Mots-clés :** Analyse métabolomique, prédiction de phénotypes

**Auteurs :** Magali San Cristobal<sup>1,2,3,4,5\*</sup>, Marie-Pierre Sanchez<sup>6,7</sup>, Marie-José Mercat<sup>8</sup>, Florian Rohart<sup>9</sup>, Laurence Liaubet<sup>1,2,3</sup>, Thierry Tribout<sup>6,7</sup>, Cécile Canlet<sup>10</sup>, Nelly Muller<sup>11</sup>, Jérôme Molina<sup>10</sup>, Nathalie Ianucelli<sup>1,2,3</sup>, Béatrice Laurent<sup>4,5</sup>, Nathalie Villaneix<sup>12,13</sup>, Alain Paris<sup>14,15</sup>, Denis Milan<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> INRA, UMR1388 Génétique, Physiologie et Systèmes d'Elevage, F-31326 Castanet-Tolosan, France ;

<sup>2</sup> Université de Toulouse INPT ENSAT, UMR1388 Génétique, Physiologie et Systèmes d'Elevage, F-31326 Castanet-Tolosan, France ;

<sup>3</sup> Université de Toulouse INPT ENVT, UMR1388 Génétique, Physiologie et Systèmes d'Elevage, F-31076 Toulouse, France;

<sup>4</sup> INSA, Département de Génie Mathématiques, F-31077 Toulouse cedex 4, France ;

<sup>5</sup> Université de Toulouse, UMR5219, Institut de Mathématiques, F-31077 Toulouse, France ;

<sup>6</sup> INRA, UMR1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, F-78530 Jouy-en-Josas, France ;

<sup>7</sup> AgroParisTech, UMR1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, F-78350 Jouy-en-Josas, France ;

<sup>8</sup> IFIP, La Motte au Vicomte, F-35651 Le Rheu cedex, France;

<sup>9</sup> Australian Institute for Bioengineering & Nanotechnology (AIBN), The University of Queensland, QLD 4072, Australia ;

<sup>10</sup> INRA, UMR1331 ToxAlim, F-31027 Toulouse cedex 3, France ;

<sup>11</sup> INRA, UE0450 UETP, F-35653 Le Rheu cedex, France ;

<sup>12</sup> Université Paris I Panthéon-Sorbonne, EA4543 SAMM, F-75634 Paris cedex 13, France ;

<sup>13</sup> INRA, UR 0875 MIA-T, F-31326 Castanet-Tolosan, France ;

<sup>14</sup> INRA, UMR0914 PNCA, F-75231 Paris Cedex 05, France;

<sup>15</sup> MNHN, UMR7245, MCAM, F-75005 France.

\*E-mail de l'auteur correspondant : [magali.san-cristobal@toulouse.inra.fr](mailto:magali.san-cristobal@toulouse.inra.fr)

**Le métabolome dans le sang peut aider à prédire la composition corporelle des porcs (taux de muscle des pièces ou poids de certaines pièces de la carcasse comme le jambon) ainsi que le rendement de carcasse et la consommation moyenne journalière**

## Résumé :

Cette étude visait à quantifier le pouvoir prédictif du métabolome sur des phénotypes de production dans la filière porcine. Des données métabolomiques ont été obtenues par Résonance Magnétique Nucléaire à partir d'une prise de sang réalisée pendant la période de croissance de l'animal. Selon le type de phénotype considéré, un spectre métabolomique peut être envisagé comme une source de biomarqueurs intéressants. Ainsi, le taux de muscle des pièces de la carcasse a pu être correctement prédit à partir des mesures prises sur des prélèvements réalisés à environ 60 kg.

## Abstract: Metabolomics, a way to find new biomarkers?

This study was aimed at quantifying the predictive power of metabolomic data on production phenotypes in the pig. Metabolomic data were obtained by Nuclear Magnetic Resonance from one blood sample during the growing period of the animals. Depending on the phenotype, a metabolomic spectrum can be envisioned as a source of suitable biomarkers. In particular, the lean meat percentage was correctly predicted from samples taken at around 60 kg.

## INTRODUCTION

Il est possible de mettre en lien un « omome » particulier (génomome, transcriptome, protéome, métabolome, voir Encadré 1) avec un ou plusieurs phénotypes d'intérêt, soit pour comprendre les mécanismes biologiques sous-jacents (comprendre par exemple quels gènes sont impliqués dans la variation de la couleur de la viande), soit pour prédire un phénotype d'intérêt : c'est la recherche de biomarqueurs. Les polymorphismes de l'ADN sont utilisés comme prédictors de phénotypes (plus exactement des valeurs génétiques) en sélection génomique.

Peut-on imaginer se servir des autres « omomes » comme prédictors de phénotypes ?

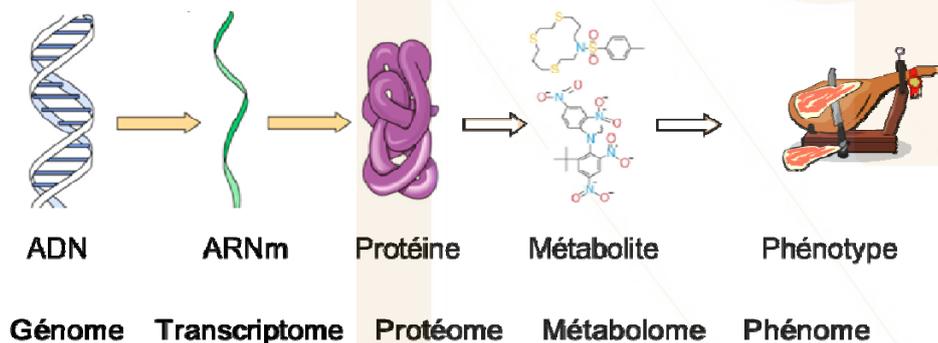
A la différence de la séquence génomique, les autres « omomes » sont influencés partiellement par l'environnement. Par exemple, le taux de sucre dans le sang est fonction de l'individu, mais aussi de son alimentation ; c'est pour éliminer cet effet que l'on demande souvent une prise de sang à jeun.

Comme le métabolome est proche des phénotypes finaux dans la cascade biologique et qu'il est d'acquisition peu coûteuse par RMN, nous avons voulu savoir s'il pouvait être un bon prédictor des phénotypes de production dans l'espèce porcine.

### Qu'est-ce que le métabolome ?

Toutes les informations nécessaires au fonctionnement d'un être vivant sont codées dans la grande molécule d'ADN qui constitue le génome. Ces informations sont mobilisées en lieu et en heure dans les tissus cibles. Une longue cascade biologique se met alors en place ; les gènes mobilisés sont transcrits en ARN messagers (l'ensemble des ARNm est appelé le transcriptome), qui sont traduits en protéines (formant le protéome), qui interagissent entre elles pour générer des molécules appelées métabolites reflétant le fonctionnement intime des cellules. Le métabolome constitue l'ensemble des métabolites quantifiables et apparaît plus proche du phénotype final (Figure 1). A titre d'exemple, les sucres et les lipides quantifiés dans une prise de sang sont des métabolites.

**Figure 1 : Schéma de la cascade biologique entre le génome et le phénotype de production**



Les gènes sont transcrits en ARN messagers, eux-mêmes traduits en protéines, qui interviennent dans la mécanique "chimique" de production de métabolites, ceux-ci ayant un effet sur le phénotype final.

Des noms à terminaison en « omome » ont été créés pour définir l'ensemble des molécules d'ADN (génomome), d'ARNm (transcriptome), des protéines (protéome), des métabolites (métabolome) et des phénotypes (phénome) d'un individu ou d'un tissu.

La technologie actuelle des puces SNP permet l'accès à plusieurs dizaines voire milliers de polymorphismes au sein des gènes d'un individu. Avec le séquençage du génome, il deviendra même de plus en plus courant d'avoir l'information génomique complète. Il existe déjà des puces à haut débit pour le transcriptome (jusqu'à 60 000 transcrits). Quant au métabolome, deux grandes techniques sont en usage actuellement : la spectrométrie de masse (SM) et la résonance magnétique nucléaire (RMN). La RMN permet d'explorer un répertoire de quelques centaines de métabolites de petits poids moléculaires. Son coût est relativement abordable, ce qui permet d'explorer et de comparer le métabolome de plusieurs centaines d'individus. La technique de RMN peut donc être utilisée à plus grande échelle. Elle s'applique surtout à des fluides (urine, plasma sanguin) et fournit en sortie des spectres tels que celui présenté en Figure 2. Un spectre peut être vu comme la signature métabolique d'un individu observé dans un état physiologique donné.

Le lien entre le spectre métabolomique et les métabolites est un peu complexe, dans le sens où un métabolite précis peut se trouver à un ou plusieurs endroits du spectre (toujours les mêmes). L'aire sous la courbe au niveau d'un pic sera toujours proportionnelle à la quantité de métabolite dans le fluide. Cependant, un pic peut correspondre à un ou plusieurs métabolites. Ainsi, si un pic semble un bon prédictor (pic haut pour des individus sains et pic bas pour des malades par exemple), il peut être difficile d'identifier le(s) métabolite(s) responsable(s). Cette question d'identification n'est cependant pas primordiale dans un premier temps dans le cas de recherche de biomarqueurs, puisque c'est la qualité de la prédiction d'un phénotype qui nous intéresse, et non la compréhension des mécanismes biologiques sous-jacents qui pourraient être impliqués.

## I. MATERIEL ET METHODES

### I.1. Animaux et phénotype

Un total de 506 porcs de races Large White, Landrace et Piétrain ont été contrôlés à l'unité expérimentale de testage des porcs du Rheu (Ille et Vilaine).

Les poids des animaux et la quantité d'aliment ingéré ont été contrôlés entre 35 et 110 kg environ, ce qui a permis d'estimer le gain moyen quotidien (GMQ), l'indice de consommation (IC) et la consommation moyenne journalière (CMJ).

En fin de contrôle, les animaux ont été abattus dans un abattoir commercial et différents caractères de composition corporelle ont été estimés à partir des mesures effectuées sur la carcasse. Le rendement de carcasse (RDT) a été calculé en faisant le rapport entre les poids net de la carcasse (PNET) et vif de l'animal (PVIF). La longueur atlas-pubis (LONG), les épaisseurs de lard mesurées à la fente en différents sites (EPLrein, EPLdos et EPLcou) ainsi que leur moyenne (EPLM) et les épaisseurs de gras (G2) et de muscle (M2) ont été mesurées. La teneur en viande maigre (TVM) a été

### I.2. Métabolome

Une prise de sang a été effectuée durant la période de croissance (à environ 60 kg de poids vif), à partir de laquelle

### I.3. Analyses statistiques

Une approche statistique a été adoptée pour prédire chacun des 22 phénotypes à notre disposition. La démarche a été schématiquement la suivante : une partie des animaux (les 2/3) a servi à apprendre un modèle (estimer les paramètres), puis la partie restante (1/3) a permis de quantifier la qualité du modèle en comparant les phénotypes

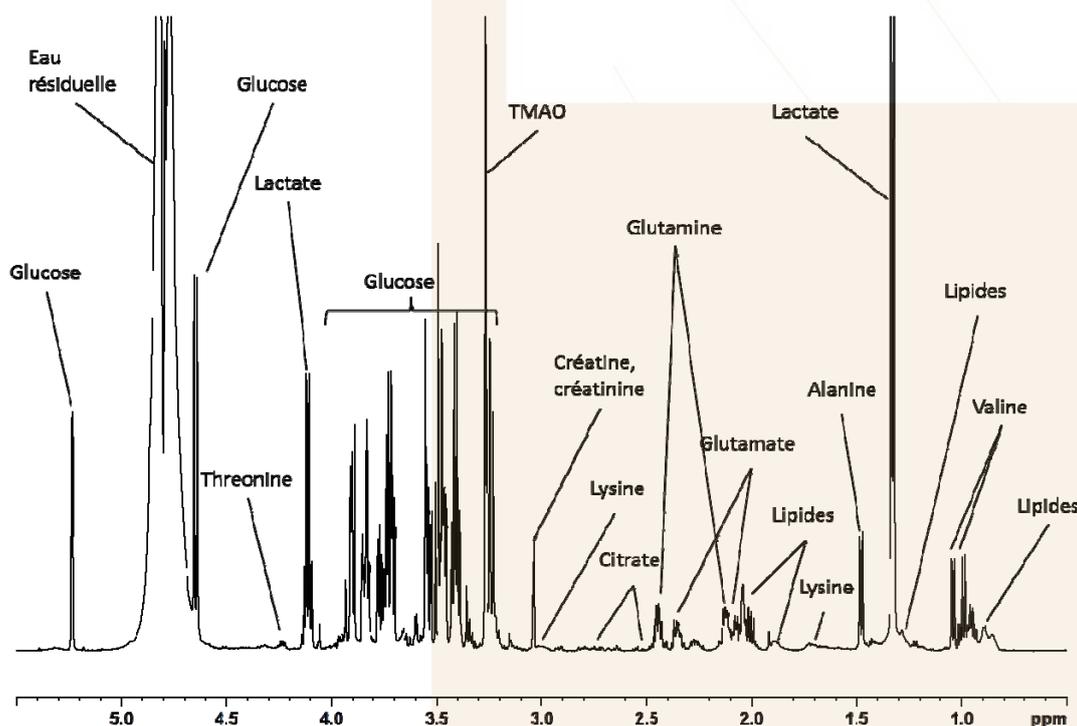
estimée à l'aide de l'équation suivante :  $TVM = 62,19 - (0,729 \times G2) + (0,144 \times M2)$ . La demi-carcasse droite a été pesée (DEM) puis découpée selon une découpe hollandaise normalisée et les morceaux ont été pesés : jambon (JAM), poitrine (POI), épaule (EPAU), longe (LON) et bardière (BAR). Le taux de muscle des pièces (TMP) a été estimé selon l'équation :  $TMP = 25,08 - (1,23 \times (100 \times BAR/DEM)) + (0,87 \times (100 \times LON/DEM)) + (0,73 \times (100 \times JAM/DEM))$ .

Plusieurs critères de qualité de viande ont également été mesurés sur le jambon 24h après l'abattage : le pH du muscle demi-membraneux (ou *semimembranosus*) (PHDM), les coordonnées L\*, a\* et b\* (système CIELAB, Minolta) et le temps d'imbibition d'un morceau de papier pH sur le muscle fessier superficiel (ou *gluteus superficialis*) (L\*GS, a\*GS, b\*GS et IMB, respectivement). L'indice de qualité de viande (IQV) a été calculé selon la formule :  $IQV = 34 + (11,04 \times PHDM) + (0,105 \times IMB) - (0,231 \times L*GS)$ .

le métabolome du plasma a été mesuré par RMN.

réellement observés avec les pseudo-phénotypes prédits par le modèle. Le tirage au sort et l'analyse des données ont été répétés un grand nombre de fois. C'est donc une erreur de prédiction moyenne obtenue à partir d'un grand nombre de tirages aléatoires qui va être présentée dans la suite.

**Figure 2 : Spectre métabolomique RMN (zoom) d'un échantillon de plasma (sang)**



Le déplacement chimique est représenté en abscisse. Chaque valeur du spectre en ordonnée est susceptible de varier d'un individu à un autre ; elle représente donc un biomarqueur potentiel.

## II. PREDICTION DE PHENOTYPES A L'AIDE DU METABOLOME : PREMIERS RESULTATS

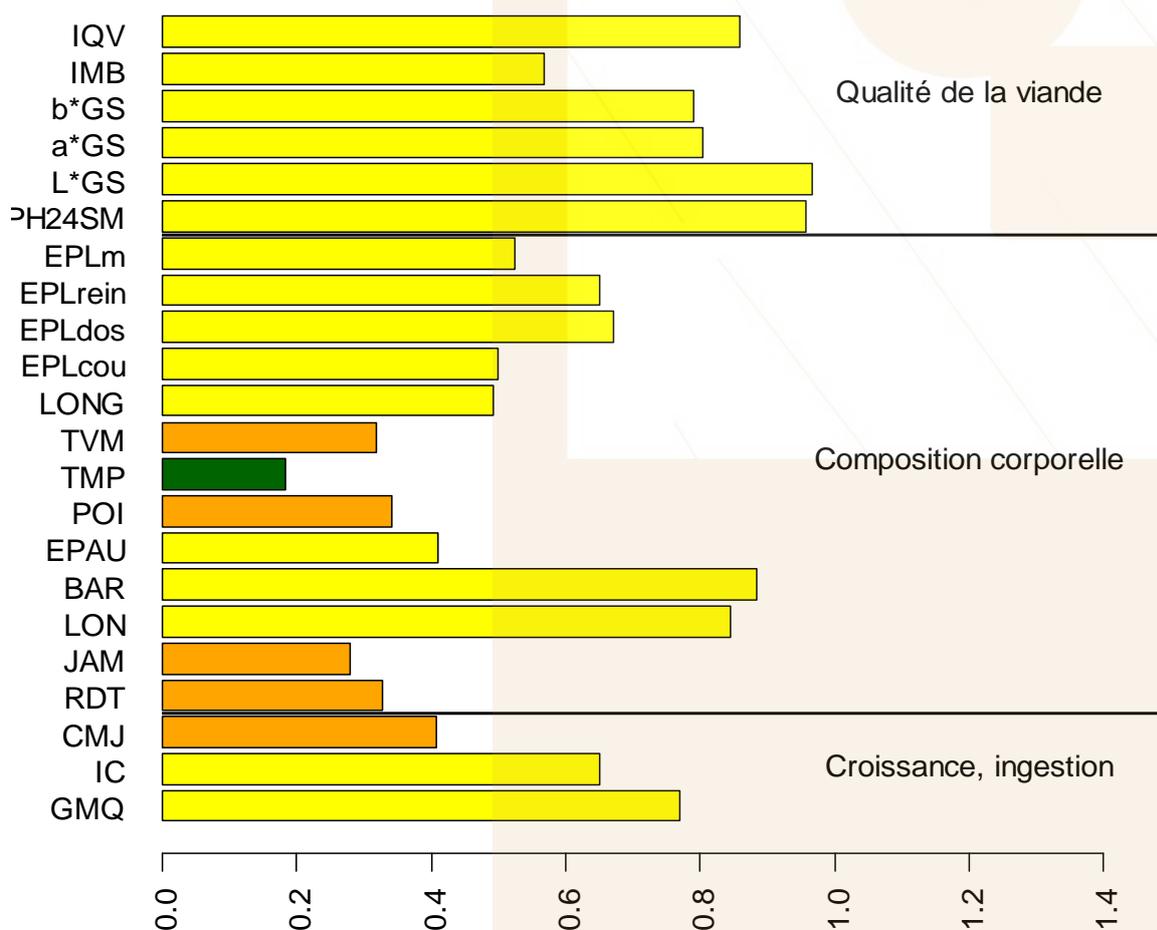
Un exemple de spectre RMN est donné en Figure 2. Le profil présenté est découpé régulièrement tout le long de l'abscisse en près de 300 intervalles pour lesquels le signal est intégré. L'analyse de ce jeu de données en l'état actuel des connaissances a révélé 65 déplacements chimiques d'intérêt (à savoir des portions spécifiques du spectre), dont 7 correspondent en fait à du bruit, 11 à des métabolites non identifiés, et 52 à un ou plusieurs métabolites (ou familles de métabolites).

L'erreur moyenne de prédiction sur les différents tirages est présentée en Figure 3 pour l'ensemble des phénotypes. Trois classes de prédiction ont été grossièrement dégagées : qualités de prédiction bonne, moyenne et médiocre. Les caractères de composition de carcasse sont les caractères les mieux prédits par le métabolome sanguin. La teneur en

viande maigre estimée à partir du poids des morceaux de la carcasse (taux de muscle des pièces ou TMP) est le phénotype le mieux prédit ( $R^2=0,8$  sur l'échantillon d'apprentissage servant à apprendre le modèle,  $R^2=0,7$  sur l'échantillon test servant à évaluer la prédiction). D'autres phénotypes comme la TVM commerciale, les poids de la poitrine (POI), de l'épaule (EPAU) et du jambon (JAM) et le rendement de carcasse (RDT) sont également bien prédits. Parmi les caractères de croissance, seule la consommation moyenne journalière (CMJ) est relativement bien prédite ( $R^2=0,6$ ). En revanche, le métabolome mesuré sur un échantillon de sang prélevé en période de croissance ne permet pas de prédire de manière satisfaisante les phénotypes liés à la qualité de la viande.

**Figure 3 : La qualité de prédiction de 22 phénotypes de production à partir du métabolome sanguin est très variable selon les phénotypes**

Les erreurs moyennes de prédiction sont présentées. Ces erreurs sont moindres pour le phénotype TMP (taux de muscle estimé à partir des pièces). Trois classes de prédiction peuvent être dégagées : bonne (couleur verte), moyenne (orange) et médiocre (jaune).



*Croissance, ingestion et efficacité alimentaire* : Gain moyen quotidien ( $\text{kg}\cdot\text{j}^{-1}$ ) : GMQ, Indice de consommation ( $\text{kg}\cdot\text{kg}^{-1}$  poids vif) : IC, Consommation moyenne journalière ( $\text{kg}\cdot\text{j}^{-1}$ ) : CMJ ; *Composition corporelle* : Rendement de carcasse (%) : RDT, Poids du jambon (kg) : JAM, Poids de la longe (kg) : LON, Poids de la bardière (kg) : BAR, Poids de l'épaule (kg) : EPAU, Poids de la poitrine (kg) : POI, Teneur en muscle estimée à partir des pièces (%) : TMP, Teneur en viande maigre (%) : TVM, Longueur de carcasse (mm) : LONG, Epaisseur de lard du cou (mm) : EPLcou, Epaisseur de lard du dos (mm) : EPLdos, Epaisseur de lard au niveau des reins (mm) : EPLrein, Epaisseur de lard moyenne (mm) : EPLm ; *Qualité de la viande* : pH 24h du muscle *semimembranosus* : pH24SM, clarté L\* du muscle *gluteus superficialis* : L\*GS, indice a\* de coloration rouge du muscle *gluteus superficialis* : a\*GS, indice b\* de coloration jaune du muscle *gluteus superficialis* : b\*GS, Temps d'imbibition du muscle *gluteus superficialis* (10s) : IMB, Indice de qualité de viande : IQV.

### III. DISCUSSION

La médiocre prédiction des phénotypes de qualité de viande (IQV, IMB, couleurs et pH) peut s'expliquer par le fait que ces phénotypes sont principalement influencés par les conditions d'abattage (porcs abattus à un poids d'environ 110kg) et de mise à jeun. Or, l'information métabolomique de cette étude provenait d'une prise de sang réalisée durant la période de croissance (à environ 60 kg). Afin d'appréhender la puissance prédictive du métabolome comme source de biomarqueurs pour la qualité de la viande, il pourrait être intéressant de mesurer l'information métabolomique sur un échantillon de sang prélevé au moment de l'abattage.

Le taux de muscle des pièces est le phénotype le mieux prédit dans cette étude. Il est d'une importance économique majeure car influant directement sur la rémunération de l'abattoir et de l'éleveur. On peut noter que le phénotype est prédit en grande partie par la race. Cela indique aussi que le métabolome porte l'information de la race. La prédiction intra-race ne peut être évaluée ici, les effectifs étant trop faibles.

Nous avons identifié les pics du spectre métabolomique qui avaient un fort pouvoir prédictif. Pour le taux de muscle des pièces, ainsi que pour d'autres phénotypes liés, la

créatinine est apparue comme le meilleur prédicteur. Elle est liée à la masse musculaire, donnant ainsi une cohérence biologique aux résultats statistiques.

L'expérience résumée dans ce texte est une première du genre appliquée à l'espèce porcine. Elle est intéressante à ce titre. Le revers de la médaille est la présence de petites imperfections. En effet, les prises de sang n'ont pu être effectuées à un moment standardisé : ni par rapport au dernier repas (et ceci est sans doute le point le plus délicat), ni par rapport au stade de croissance ou à l'âge (mais pour ces aspects, la variabilité entre animaux est faible).

Malgré ces imperfections, la puissance de prédiction du métabolome sanguin durant la période de croissance peut être suffisamment intéressante pour envisager dans le futur l'utilisation de ce type de données comme biomarqueurs. De nouvelles études pourraient être mises en place avec des effectifs plus importants, de nouveaux caractères (comme le gras intramusculaire, ou des caractères liés à la santé ou la robustesse, l'odeur de mâle entier, ...), et des prises de sang réalisées à différents stades de la vie de l'animal (naissance, sevrage, abattage,...) afin de préciser le moment adéquat de prélèvement selon le phénotype à prédire.

#### Remerciements

Cette étude a reçu le soutien financier de l'ANR et de BIOPORC pour l'acquisition des données, et de l'INRA et la Région Midi-Pyrénées pour la thèse de Florian ROHART.

#### Bibliographie

Cet article est un résumé d'un article paru en anglais dans *Journal of Animal Science*  
F. Rohart, A. Paris, B. Laurent, C. Canlet, J. Molina, M. J. Mercat, T. Tribout, N. Muller, Iannuccelli, N. Villa-Vialaneix, L. Liaubet, D. Milan and M. San Cristobal (2012). Phenotypic prediction based on metabolomic data for growing pig from three main European breeds. *J ANIM SCI*, 90:4729-4740. doi: 10.2527/jas.2012-5338