

# Identification par transcriptomique de biomarqueurs de la qualité de la viande de porc

Bénédicte LEBRET (1, 2), Katy DENIEUL (1, 2), Annie VINCENT (1, 2), Nathalie BONHOMME (1, 2),  
Joanna WYSZYNSKA-KOKO (1, 2), Lars KRISTENSEN (3), Jette F. YOUNG (4), Marie DAMON (1, 2)

(1) INRA, UMR 1348 PEGASE, 35590 Saint-Gilles, France

(2) Agrocampus Ouest, UMR 1348 PEGASE, 35000 Rennes, France

(3) Danish Meat Research Institute, Maglegårdsvej 2, 4000 Roskilde, Denmark

(4) AarhusUniversity, Faculty of Agricultural Sciences, Department of Food Science, 8830 Tjele, Denmark

*Benedicte.Lebret@rennes.inra.fr*

*Avec la collaboration de Patrick ECOLAN (1, 2), Jacques LEPETIT (†) (INRA, QuaPA, 63122 Theix), Karine METEAU (INRA EASM, Le Magneraud, 17700 Surgères), Sophie BARTHELEMY et Pierre-Yves POLLET (Filière Porc Basque, 64430 Les Aldudes)*

## Identification par transcriptomique de biomarqueurs de la qualité de la viande de porc

Le déterminisme des composantes sensorielle et technologique de la qualité de la viande de porc est complexe. De nombreux facteurs influençant la qualité ont été identifiés ; toutefois celle-ci présente encore une variabilité élevée et est difficile à prédire. Afin de mieux comprendre la construction biologique de la qualité de la viande et d'en identifier des biomarqueurs, nous avons étudié les associations entre le transcriptome musculaire et des caractères technologiques et sensoriels (pH, perte en eau, couleur, lipides intramusculaires, force de cisaillement, tendreté) dans un dispositif expérimental incluant des porcs de races contrastées (Basque et Large White, n=50) issus de différents systèmes d'élevage, conduisant à une variabilité élevée de qualité. De nombreuses corrélations entre l'expression de gènes et plusieurs caractères de qualité ont été obtenues par analyse transcriptomique. L'expression de 40 de ces gènes quantifiée par RT-PCR a permis de confirmer 113 associations transcrit-caractère de qualité ( $P < 0,05$ ,  $|r| \leq 0,73$ ), parmi lesquelles 60 ont ensuite été validées ( $P < 0,05$ ,  $|r| \leq 0,68$ ) sur des données indépendantes (n=50) du même dispositif. Puis, sur des animaux commerciaux d'origine différente (n=100), 19 associations ont été validées ( $P < 0,05$ ,  $|r| \leq 0,49$ ) pour différents caractères : pH (6), pertes en eau (4), L\* (5), h° (2), lipides intramusculaires (1) et tendreté (1). Enfin, des modèles de régression multiple incluant 3 à 5 gènes permettent d'expliquer jusqu'à 59% de la variabilité d'un caractère. Des biomarqueurs de la qualité de la viande de porc ont donc été identifiés et validés. Toutefois, leur valeur prédictive devra être améliorée afin de développer des outils d'évaluation précoce post-mortem de la qualité.

## Identification by transcriptomics of biomarkers of pork quality

The development of technological and sensory pork quality traits is a complex phenomenon. Many factors influencing pork quality have been identified so far, but pork quality is still highly variable and difficult to predict. In order to better understand the development of pork quality and identify molecular markers, associations between muscle transcriptome and technological and sensory traits (pH, drip loss, colour, intramuscular fat, shear force, tenderness) were established in an experimental design. This included pigs from contrasted breeds (Basque and Large White, n=50) produced in different systems, which led to great variability in quality. Many correlations between gene expression and meat quality traits were identified by transcriptomic analysis. Using RT-PCR for the quantification of expression of 40 of these genes, 113 transcript-trait associations were confirmed ( $P < 0.05$ ,  $|r| \leq 0.73$ ), of which 60 were validated ( $P < 0.05$ ,  $|r| \leq 0.68$ ) on independent data (n=50) from the same experiment. Then, using pigs from a different origin produced in a commercial pork chain (n=100), 19 of these transcript-trait associations were validated ( $P < 0.05$ ,  $|r| \leq 0.49$ ) for various pork quality traits: pH (6), drip loss (4), L\* (5), h° (2), intramuscular fat (1) and tenderness (1). Multiple regression models including 3 to 5 genes explain up to 59% of the variability of a quality trait. Biomarkers of pork quality have thus been identified and validated. However their predictive value remains to be improved for the further development of early post-mortem tools to assess pork quality.

## INTRODUCTION

Les composantes sensorielle et technologique de la qualité des viandes porcines résultent d'interactions complexes entre le type génétique, les conditions d'élevage, d'abattage et les procédés de transformation des carcasses et des viandes (Sellier et Monin, 1994 ; Rosenvold et Andersen, 2003 ; Lebret, 2008 pour revue). Si de nombreux facteurs influençant la qualité ont été identifiés, sa variabilité reste élevée et les propriétés musculaires conduisant à une qualité élevée ne sont pas bien établies (Ngapo et Gariépy, 2008). L'identification de biomarqueurs précoces post-mortem (p.m.) de la qualité et le développement d'outils rapides de prédiction seraient utiles en industrie pour classer les carcasses ou les pièces dans les heures suivant l'abattage, et optimiser leur utilisation (transformation en frais, sec,...).

La transcriptomique, qui quantifie l'expression de quasiment tous les gènes dans un tissu à un temps donné, est d'un grand intérêt pour étudier des phénomènes complexes résultant d'interactions génétique X environnement tels que la qualité de la viande, et identifier des biomarqueurs, c'est-à-dire des gènes dont le niveau d'expression est associé à la valeur du caractère. Cette recherche de biomarqueurs de qualité a été entreprise dans le module « Qualité des viandes et produits » du programme de recherche européen Q-Porkchairs (www.q-porkchairs.org, 2007-2012) (Te Pas *et al.*, 2012). Dans ce but, nous avons développé un dispositif expérimental induisant une variabilité élevée des qualités technologique et sensorielle de la viande, basé sur l'utilisation de deux races contrastées (Basque, race locale conduisant à des produits de qualité élevée et Large White, race conventionnelle) produites dans différents systèmes d'élevage (conventionnel, alternatif ou extensif). Les résultats de composition musculaire et qualité de viande de ces animaux ont été présentés récemment (Lebret *et al.*, 2011). La démarche présentée ici a consisté à i) associer les niveaux de transcrits (ARNm) musculaires aux caractères de qualité afin d'identifier des biomarqueurs, ii) confirmer les associations entre les expressions géniques (quantifiées par RT-PCR : technique plus rapide et applicable à grande échelle) et qualité sur les mêmes animaux, iii) valider ces associations sur un jeu de données indépendant issu du même dispositif expérimental et enfin iv) valider ces associations sur des animaux commerciaux de génotype différent (validation externe).

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1. Animaux et mesures de qualité pour l'identification, la confirmation et la validation interne des biomarqueurs

Les animaux utilisés dans le dispositif ont été décrits par Lebret *et al.* (2011). Brièvement, deux répétitions expérimentales (R1 et R2) incluant chacune 50 porcs mâles castrés de race pure Basque (B, n=30) ou Large White (LW, n=20) ont été élevés en système conventionnel (caillebotis total, 1m<sup>2</sup>/porc), alternatif sur litière avec accès à une courette extérieure (2,4 m<sup>2</sup>/porc) ou, pour les porcs B uniquement, en système extensif de la filière Basque (parc, 2,5 ha). Dix porcs par race étaient élevés dans les différents systèmes (35 à 145 kg). A l'abattage, du muscle *Longissimus lumborum* (LM, dernière côte) a été prélevé à 30 min p.m. et congelé immédiatement dans l'azote liquide en vue des analyses d'expression génique. L'ensemble des mesures de qualité de viande (QV) du LM a été décrit précédemment (Lebret *et al.*, 2011).

Parmi ces caractères, le pH ultime, la couleur (L\*: luminance, a\*: indice de rouge et h°: angle de teinte rouge vers jaune, fortement corrélé à l'intensité de couleur rouge évaluée par le jury sensoriel), la teneur en lipides intramusculaires (LIM), les pertes en eau à 3 j p.m. (méthode Honikel, tranche suspendue en sac à 4°C), la force maximale de cisaillement (FC, Warner-Bratzler) de la viande cuite et la tendreté sensorielle (note de 0 à 10) de la longe (LM) ont été retenus dans le présent travail.

### 1.2. Analyses d'expression des gènes

#### 1.2.1. Transcriptome musculaire et association avec la qualité

Les ARN totaux ont été extraits au Trizol. Sur tous les porcs R1, le transcriptome du LM a été analysé avec une puce 15 K Agilent spécifique muscle développée au laboratoire. Brièvement, les 50 échantillons d'ARN et la référence (pool des 50 échantillons) ont été marqués au Cy3 ou Cy5, respectivement. L'hybridation, l'acquisition des images et la quantification des signaux bruts ont été réalisés comme décrit récemment (Damon *et al.*, 2012a). Les données (disponibles sous GEO, Gene Express Omnibus n° GSE33958) ont été normalisées intra-lame et entre lames (R Development Core-Team, 2008) et filtrées (élimination des spots de faible variation d'intensité entre échantillons) conduisant à retenir 4870 spots pour les analyses statistiques. Les données d'expression ont été ajustées par analyse de variance pour l'effet lame lorsqu'il était significatif (P<0,05). Les corrélations (Pearson) entre les expressions géniques (4870 spots) et les 8 caractères de QV : pH ultime (pHu), pertes en eau, couleur (L\*, a\*, h°), LIM, FC et tendreté ont été calculées (R) en appliquant une procédure de correction pour tests multiples (Benjamini-Hochberg, BH). Les associations gène-caractère présentant une P-value ajustée BH<0,1 ont été retenues.

#### 1.2.2. Expression des gènes par RT-PCR temps réel

Les étapes de confirmation (échantillons R1) et de validation (échantillons R2) des associations entre le niveau d'expression des gènes et les caractères de QV ont été réalisées par RT-PCR temps réel. Cette technique plus spécifique, sensible, rapide, facile à mettre en œuvre et moins onéreuse que le transcriptome, apparaît mieux adaptée au développement ultérieur d'outils de quantification de biomarqueurs.

En raison du très grand nombre de gènes dont l'expression sur puce est corrélée à un ou des caractères de QV, 40 gènes ont été choisis pour confirmation par PCR sur la base de leur corrélation élevée avec un ou plusieurs caractères de QV ( $|r| \geq 0,3$ ) et leur signification biologique, afin de représenter au mieux les différentes fonctions associées à la qualité de viande, révélées par l'analyse fonctionnelle des transcrits (Damon *et al.*, 2012b). Les analyses de RT-PCR ont été réalisées comme décrit précédemment (Damon *et al.*, 2012a).

### 1.3. Validation externe des biomarqueurs

Après validation interne (porcs R2), une validation externe des associations entre expressions géniques et caractères de QV a été réalisée sur des porcs commerciaux (PC) produits et phénotypés pour la qualité par des partenaires du programme (Danish Crown, DMRI). Cent porcs mâles castrés et femelles Duroc X (Landrace X Yorkshire) ont été abattus (115 kg) et du muscle LM prélevé (15 min p.m.) pour extraction des ARN. Le pHu et la couleur ont été mesurés à 24h p.m. Les pertes en eau ont été déterminées (méthode EZ driploss 24-48h, dont les résultats sont fortement corrélés à ceux obtenus par la méthode Honikel :  $r=0,84$  d'après Mérour *et al.*, 2007).

La teneur en LIM a été déterminée par extraction dans l'éther de pétrole ( $r=0,98$  avec extraction au chloroforme-méthanol pratiquée sur R1 et R2 ; Lebret, données personnelles). La tendreté de la longe (rôti) a été évaluée par un jury sensoriel (note de 0 à 10). L'extraction des ARN du LM et la synthèse d'ADNc des 100 échantillons PC ont été réalisées à l'Université de Aarhus, puis transmis à l'UMR PEGASE pour la réalisation des analyses de PCR.

#### 1.4. Analyses de régression

Les corrélations (Pearson) entre l'expression des gènes par PCR et les caractères de QV ont été calculées (R) sur les données R1 pour confirmation des biomarqueurs, sur R2 pour validation interne, puis sur les porcs commerciaux (PC) pour validation externe. Une corrélation entre un gène et un caractère est confirmée ( $P<0,10$ ) si elle est déjà observée sur les données de transcriptome ( $P<0,05$ ) avec le même sens de corrélation (+ ou -). Une corrélation est validée en interne si elle est observée sur R1 et sur R2 ( $P<0,10$ , même sens de corrélation). Enfin, une corrélation est validée en externe si elle est observée sur PC ( $P<0,10$ ) et R1 ou R2 (même sens de corrélation).

Par ailleurs, plusieurs transcrits étant corrélés à chaque caractère de QV sur R1 et R2, des régressions multiples pas à pas (stepwise) ont été calculées en utilisant les données de QV comme variable à expliquer et les données de RT-PCR comme variables explicatives (seuil  $P=0,05$  ; SAS Inst. Inc., Cary, NC).

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

### 2.1. Transcrits associés à la qualité de viande

Le jeu de données constitué à partir des deux races de porcs élevés dans différents systèmes de production présente comme attendu une grande variabilité pour chaque caractère de qualité technologique ou sensorielle (Tableau 1; Lebret *et al.*, 2011). Les valeurs obtenues correspondent aux gammes de valeurs généralement rencontrées pour ces caractères chez des porcs de différents génotypes.

L'analyse transcriptomique a permis de retenir 4870 sondes présentant une grande variabilité d'expression. Ce résultat associé à la variabilité élevée intra-caractère de qualité est favorable pour identifier des associations transcrit(s)-caractère et retenir des gènes comme biomarqueurs potentiels.

Ainsi, entre plus d'une centaine et plusieurs milliers d'associations significatives ( $P$ -ajustée BH  $< 0,10$ ) ont été obtenues (Tableau 2). Pour chaque caractère, la valeur la plus élevée des coefficients de détermination ( $R^2$ ) se situe entre 0,41 ( $a^*$ ) et 0,65 (tendreté), ce qui signifie que le niveau d'expression d'un gène (puce) peut expliquer jusqu'à 65% de la variance phénotypique du caractère. Le grand nombre et le niveau modéré à élevé des corrélations obtenues avec les caractères de QV sont prometteurs pour l'identification de biomarqueurs. A notre connaissance, ce travail d'identification de biomarqueurs de qualité de la viande de porc est le premier à considérer simultanément plusieurs caractères technologiques et sensoriels. Jusqu'ici, les études ont porté sur un (pertes en eau, LIM) ou quelques caractères technologiques (pHu, pertes en eau, couleur, conductivité).

En analysant le transcriptome de porcs F2 Duroc X Piétrain NN présentant une variabilité de pertes en eau (longe) de 0,9 à 3,3%, Ponsuksili *et al.* (2008) ont identifié 1289 transcrits dont les niveaux étaient corrélés positivement ou négativement à ce caractère ( $0,37<|r|<0,67$ ).

Notre étude met en évidence deux fois plus de gènes dont l'expression est corrélée à ce caractère avec des niveaux de corrélation équivalents ( $r=0,35$  à  $0,68$ ).

**Tableau 1** – Caractères de qualité du muscle *Longissimus* des animaux R1 (n=50), R2 (n=50) et PC (n=100)

Caractère	Données	Moy	ET	Min	Max
pHu	R1	5,57	0,14	5,34	6,13
	R2	5,54	0,16	5,32	6,09
	PC	5,55	0,11	5,38	6,01
Pertesen eau, %	R1	1,58	1,26	0,20	4,94
	R2	1,61	1,52	0,28	6,78
	PC	3,93	1,99	0,24	8,72
L*	R1	51,7	3,5	44,3	59,0
	R2	51,6	3,3	44,8	58,6
	PC	55,4	3,0	46,5	60,1
a*	R1	9,55	1,67	5,56	14,49
	R2	8,99	1,28	6,69	11,67
	PC	6,70	1,0	4,04	8,82
h°	R1	35,6	4,4	26,5	43,9
	R2	33,7	4,9	23,6	41,1
	PC	39,5	4,0	23,7	46,3
LIM, %	R1	3,01	1,25	1,44	6,51
	R2	3,24	1,12	1,42	7,22
	PC	3,22	1,19	0,90	8,00
FC, N/cm <sup>2</sup>	R1	27,5	6,3	17,1	42,5
	R2	28,5	6,6	15,3	46,5
Tendreté	R1	4,4	0,9	2,2	5,7
	R2	4,6	0,9	2,8	6,6
	PC	4,5	0,7	2,7	5,5

Moy : moyenne ; ET : écart-type ; h° : angle de teinte ;

FC : force de cisaillement, non déterminée sur porcs PC

**Tableau 2** – Corrélations entre l'expression des gènes (puce) et les caractères de qualité calculées sur les porcs R1 (n=50)

Caractère	N gènes corrélés	Corrélations	
		R <sup>2</sup> Max. (P)	R <sup>2</sup> min. (P<0,1)
pHu	1046	0,46 (8,6E <sup>-04</sup> )	0,12
Perte eau	2884	0,59 (3,2E <sup>-07</sup> )	0,09
L*	1004	0,44 (1,4E <sup>-03</sup> )	0,13
a*	140	0,41 (5,6E <sup>-03</sup> )	0,19
h°	2290	0,52 (2,3E <sup>-05</sup> )	0,10
LIM	2219	0,52 (1,9E <sup>-05</sup> )	0,10
FC	1980	0,62 (2,5E <sup>-07</sup> )	0,10
Tendreté	2962	0,65 (3,0E <sup>-08</sup> )	0,09

P : Valeur de P ajustée (BH) pour tests multiples

Chez des porcs Piétrain issus de verrats « approuvés pour une qualité supérieure » ou de « qualité standard », Te Pas *et al.* (2010) ont rapporté quelques associations significatives entre le transcriptome et la couleur :  $a^*$  (11),  $L^*$  (4) et la réflectance (1). Les auteurs précisent que ces associations étaient basées sur de faibles différences d'expression entre échantillons. Ainsi, le nombre, le niveau et le degré de signification des corrélations entre transcrits et caractères phénotypiques dépend du dispositif expérimental (effectif, variabilité du caractère,...) et

probablement du type de puce (tissu-spécifique ou générique) utilisés. Concernant les LIM, 2219 transcrits sont associés au caractère, ce qui est favorable pour l'identification de biomarqueurs ainsi que pour une meilleure compréhension des phénomènes biologiques contrôlant ce paramètre dont l'impact sur la qualité sensorielle et l'acceptabilité de la viande est bien établi (Lebret, 2009). A l'inverse, dans une précédente étude nous avons mis en évidence 29 gènes différentiellement exprimés entre des animaux présentant une valeur basse (1,36%) ou haute (4,58%) en LIM (Liu *et al.*, 2009). La qualité sensorielle a été jusqu'ici peu considérée dans les études

d'association transcriptome-qualité. Lobjois *et al.* (2008) ont identifié 63 gènes dont l'expression est corrélée à la FC de la longe. De façon intéressante, notre étude confirme 23 corrélations. Outre l'identification de marqueurs et une meilleure compréhension de la construction biologique de la qualité, l'approche transcriptomique peut aussi contribuer à l'étude de l'architecture génétique des caractères.

Ainsi, en combinant l'analyse transcriptomique et la génomique positionnelle (QTL d'expression), des gènes candidats contrôlant la tendreté (Lobjois *et al.*, 2008) ou les pertes en eau (Ponsuksili *et al.*, 2008) ont été identifiés.

**Tableau 3 – Gènes retenus pour quantification par RT-PCR (n=40)**

Symbole	Description	Caractères de QV associés	r max.
GLOD4	glyoxalase domain containing 4	pHu, p. eau, L*, a*, h°, LIM, FC, <b>Tend</b>	-0,8
HHATL	hedgehog acyltransferase-like	pHu, p. eau, L*, h°, LIM, FC, <b>Tend</b>	-0,78
ARV1	ARV1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	pHu, p. eau, L*, a*, h°, LIM, FC, <b>Tend</b>	0,75
UOCR11	ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit XI	p. eau, L*, a*, h°, LIM, FC, <b>Tend</b>	0,71
ZNF24	zinc finger protein 24	pHu, p. eau, L*, h°, LIM, FC, <b>Tend</b>	0,7
CAV3	caveolin 3	pHu, <b>p. eau</b> , L*, h°, LIM, <b>Tend</b>	0,68
SPARC	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	pHu, p. eau, L*, h°, LIM, FC, <b>Tend</b>	-0,68
LIPE	lipase, hormone-sensitive	<b>p. eau</b> , L*, a*, h°, LIM, FC, <b>Tend</b>	-0,66
ACACB	acetyl-CoA carboxylase beta	p. eau, h°, <b>LIM</b> , FC, <b>Tend</b>	0,65
ZNF503	Zinc finger protein 503	<b>pHu</b> , L*, h°	-0,65
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	pHu, <b>p. eau</b> , L*, h°, <b>Tend</b>	-0,64
AK2	adenylate kinase 2	pHu, p. eau, L*, <b>a*</b> , h°, LIM, FC, <b>Tend</b>	0,63
SNRK	SNF related kinase	p. eau, h°, LIM, <b>FC</b> , <b>Tend</b>	-0,63
FAM136A	family with sequence similarity 136, member A	p. eau, a*, LIM, <b>FC</b> , <b>Tend</b>	-0,62
FHL3	four and a half LIM domains 3	pHu, <b>p. eau</b> , L*, a*, h°, LIM, FC, <b>Tend</b>	-0,62
MB	myoglobin	L*, <b>a*</b> , h°	0,61
ITIH3	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 3	p. eau, <b>LIM</b> , FC, <b>Tend</b>	0,6
CA3	carbonic anhydrase III, muscle specific	pHu, <b>p. eau</b> , L*, h°, LIM, <b>Tend</b>	0,55
IL6R	interleukin 6 receptor	pHu, <b>p. eau</b> , h°, LIM, FC, <b>Tend</b>	-0,55
PPARD	peroxisome proliferator-activated receptor delta	phu, p. eau, L*, h°, <b>Tend</b>	0,55
CLCN7	chloride channel, voltage-sensitive 7	h°, <b>Tend</b>	-0,52
IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	pHu, <b>p. eau</b> , L*, h°, <b>Tend</b>	0,51
OTUD1	OTU domaincontaining 1	<b>pHu</b> , p. eau, L*, h°	0,51
NAP1	Nef-associated protein 1	<b>p. eau</b> , L*, FC, <b>Tend</b>	-0,49
BFAR	bifunctional apoptosis regulator	<b>a*</b> , LIM, FC	0,48
FABP3	fatty acid binding protein 3, muscle and heart	p. eau, L*, <b>a*</b> , h°, LIM, FC, <b>Tend</b>	0,47
FBXO8	F-box protein 8	<b>p. eau</b>	-0,47
RTP4	receptor (chemosensory) transporter protein 4	pHu, p. eau, L*, h°, LIM, <b>Tend</b>	-0,47
SPRY1	sprouty homolog 1, antagonist of FGF signaling ( <i>Drosophila</i> )	pHu, <b>p. eau</b> , L*	-0,46
PPP1R10	protein phosphatase 1, regulatory subunit 10	<b>pHu</b> , p. eau, L*, h°	0,45
ZER1	zer-1 homolog ( <i>C. elegans</i> )	pHu, <b>a*</b>	-0,44
ADAMTS8	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 8	p. eau, <b>LIM</b> , FC, <b>Tend</b>	-0,43
HNRNPL	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	<b>p. eau</b> , <b>Tend</b>	0,43
HSPD1	heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	LIM, <b>Tend</b>	0,42
MCAT	malonyl CoA:ACP acyltransferase (mitochondrial)	pHu, p. eau, L*, h°, LIM	0,42
TM9SF3	transmembrane 9 superfamily member 3	pHu, <b>p. eau</b> , L*, h°, <b>Tend</b>	-0,42
YDJC	YdjC homolog (bacterial)	<b>pHu</b> , L*, h°, FC	-0,4
TOX4	TOX high mobility group box family member 4	p. eau, L*	-0,32
ANKRD1	ankyrin repeat domain 1	<b>pHu</b> , LIM	0,3
SETD1B	SET domaincontaining 1B	h°	0,28

Caractères de qualité associés : en gras, caractère le plus fortement corrélé à l'expression du gène et r max. : coefficient de corrélation associé

## 2.2. Confirmation et validation des transcrits associés aux caractères de qualité technologique et sensorielle

### 2.2.1. Confirmation

La confirmation des associations transcrit-caractère mesurées par RT-PCR sur les porcs R1 a porté sur 40 gènes présentant une forte corrélation transcrit(puce)-caractère, impliqués dans différents processus biologiques et décrits pour certains dans la littérature : mitochondrie et chaîne respiratoire (AK2, FAM136A, GLOD4, PPARD et UQCR11), structure du muscle et contraction (ANKRD1, CAV3, FBXO8, FHL3, MB et SPARC), métabolisme lipidique (ACACB, ANKRD1, CAV3, FABP3, HHATL, LIPE, MB,MCAT et PPARD), métabolisme des glucides (PPARD et YDJC), transcription (FOS, HNRNPL, PPARD, PPP1R10, SETDB1, ZNF24 et ZNF503), inflammation, stress oxydatif et apoptose (ANKRD1, BFAR, CA3, FOS, HSPD1, IL6R, MB et SNRK), matrice extracellulaire et protéolyse (ADAMTS8, FBXO8, HSPD1, IGF1, IL6R, ITIH3 et ZER1) et transport du calcium et des chlorures (CLCN7, FOS et SPARC) (Tableau 3). Des corrélations significatives entre expression (RT-PCR) et caractère de QV ont été confirmées sur les échantillons R1 pour 33 des 40 gènes et au moins un caractère. Au total, 113 associations transcrit-caractère ont été confirmées ( $P<0,05$ ) et 15 associations avec  $0,05<P<0,10$  (Tableau 4). Ceci représente entre 7 (a\*) et 23 (pertes en eau) corrélations confirmées par caractère, avec  $|r|$  compris entre 0,24 et 0,73.

**Tableau 4** – Corrélations significatives ( $P<0,05$ ) entre les caractères de qualité et l'expression de 40 gènes aux étapes d'identification (puce-R1), de confirmation (RT-PCR-R1), validations interne (RT-PCR-R2) et externe (RT-PCR-PC)

	Puce-R1	RT-PCR-R1	RT-PCR-R2	RT-PCR-PC
pHu	15 (0,65)	12 (0,60)	10 (0,68)	6 (0,49)
Perte eau	24 (0,72)	23 (0,58)	14 (0,51)	4 (0,34)
L*	18 (0,56)	16 (0,50)	11 (0,55)	5 (0,28)
a*	7 (0,63)	7 (0,59)	4 (0,39)	0
h°	18 (0,59)	16 (0,61)	10 (0,62)	2 (0,24)
LIM	17 (0,72)	14 (0,60)	6 (0,47)	1 (0,24)
FC	9 (0,69)	7 (0,46)	1 (0,29)	ND
Tendreté	20 (0,80)	18 (0,73)	4 (0,37)	1 (0,22)

Nombre de corrélations ( $|r|$  maximum). ND : non déterminé

### 2.2.2. Validation interne

La validation a été entreprise sur les porcs R2, jeu de données présentant des valeurs moyennes et des étendues des caractères de QV similaires à ceux obtenus en R1 ( $P>0,05$ ) hormis la valeur de h° légèrement inférieure dans R2 ( $P<0,01$ ; Lebret *et al.*, 2011). Ainsi, R2 constitue bien une répétition de R1 et est donc adaptée pour l'étape de validation interne. L'expression des 33 gènes retenus à l'étape de confirmation a été quantifiée sur le LM des porcs R2. Soixante associations impliquant 26 gènes et les 8 caractères de QV ont été validées ( $P<0,05$ ) soit 53% des associations confirmées, et 11 validées avec  $0,05<P<0,10$  (soit 55%) (Tableau 4). Entre 10 et 14 associations ont été validées pour le pHu, les pertes en eau, L\* et h°, dont 10 avec  $|r|\geq 0,50$  (4 pour h° et 2 pour pHu, pertes en eau et L\*). Certaines corrélations ont été validées ( $0,30\leq|r|\leq 0,50$ ) pour les LIM (6), a\* et tendreté (4) et FC (1). Le niveau des corrélations à l'étape de validation est globalement du même ordre que celui obtenu à l'étape de confirmation, même si certaines corrélations sont plus faibles ou d'autres plus élevées.

Par ailleurs, certains gènes présentent une association avec les mêmes caractères. Par exemple, CA3, GLOD 4, SPARC et UQCR11 présentent chacun 5 associations validées ( $P<0,10$ ) dont une avec L\*, h° et IMF. CAV3, FHL3 et FOS ont 4 associations validées ( $P<0,10$ ) dont une avec pHu et pertes en eau. Les corrélations des transcrits avec les pertes en eau, L\* et h° sont de même signe, et de signe opposé avec le pHu, en accord avec les corrélations négatives bien établies entre le pHu et les pertes en eau, L\* ou h° (Huff-Lonergan *et al.*, 2002). De même les corrélations positives entre transcrits et LIM ou tendreté sont négatives avec la FC, ou inversement, en accord avec la relation généralement observée entre LIM et tendreté sensorielle (Lebret, 2009).

### 2.2.3. Validation externe

Le jeu de données PC utilisé pour la validation externe, présente des niveaux moyens et une étendue des caractères de QV très proches de ceux observés en R1 et R2 pour pHu, LIM et tendreté, légèrement supérieurs pour pertes en eau, L\* et h° et légèrement inférieurs pour a\* (Tableau 1).

Au total, 19 associations ont été validées ( $P<0,05$ ) sur ces données et 5 avec  $0,05<P<0,10$  (Tableau 4). Les plus fortes et plus nombreuses associations validées concernent le pHu (6,  $|r|\leq 0,49$ ) les pertes en eau (4,  $|r|\leq 0,34$ ) et L\* (5,  $|r|\leq 0,28$ ). Deux associations sont validées pour h°, une pour LIM et une pour tendreté ( $0,22\leq|r|\leq 0,24$ ).

Ainsi, des biomarqueurs de qualité technologique et sensorielle ont été identifiés et validés sur des données expérimentales, puis validés sur des animaux d'origine totalement différente, ce qui à notre connaissance représente un résultat tout à fait original.

Nos travaux suggèrent qu'il est plus aisé d'identifier et de valider des biomarqueurs du pHu, de la couleur ou des pertes en eau plutôt que des LIM ou des caractères sensoriels. La plus grande précision dans la mesure des caractères physico-chimiques comparés aux caractères sensoriels peut expliquer ce résultat.

D'autre part on peut émettre l'hypothèse que les processus biologiques déterminant le taux de LIM ou la qualité sensorielle sont moins actifs dans la phase précoce p.m., c'est-à-dire au moment où le muscle LM a été prélevé pour la recherche des marqueurs, par rapport aux processus déterminant le pHu, les pertes en eau ou la couleur.

Ainsi, les travaux de Liu *et al.* (2009) suggèrent que la teneur en LIM à l'abattage dépendrait en partie de l'adipogenèse à un stade plus précoce (70 kg). Le stade d'abattage ne serait donc pas la période optimale pour rechercher des biomarqueurs de la teneur en LIM à l'abattage. Enfin, le nombre et la complexité des interactions entre processus biologiques déterminant certains phénotypes comme la FC, la tendreté ou les LIM pourraient rendre plus difficile l'identification puis la validation de transcrits associés.

### 2.2.4. Combinaison de gènes explicatifs de la variabilité des caractères de qualité

Plusieurs transcrits ayant été validés pour chaque caractère dans notre dispositif expérimental, nous avons recherché par régression multiple des modèles expliquant au mieux la variabilité des caractères de QV en combinant les données de R1 et R2 (n=100). Des modèles ont été calculés pour 7 des 8 caractères considérés, un seul gène étant validé pour la FC (Tableau 5). Ces modèles incluent de 3 à 5 gènes et expliquent entre 32% (a\*) et 59% (h°) de la variabilité des caractères. La valeur prédictive de ces modèles a été testée sur les données PC (n=100).

Les corrélations entre valeur mesurée et valeur prédite par l'équation sont significatives mais peu élevées pour le pHu ( $r=0,48$ ,  $P<0,001$ ), L\* ( $r=0,30$ ,  $P<0,01$ ) a\* ( $r=0,26$ ,  $P<0,01$ ) et h° ( $r=0,31$ ,  $P<0,001$ ) et ne sont pas significatives pour les pertes en eau, les LIM ou la tendreté.

**Tableau 5** – Modèles de régression multiple des caractères de qualité établis sur les données expérimentales (R1+R2, n=100)

Caractère	N gènes	Caractéristiques du modèle		
		R <sup>2</sup>	Erreur	P
pHu	ANKRD1, GLOD4, SPRY1, RTP4	0,56	0,10	<0,001
Perte eau	GLOD4, ZNF24, SPARC, PPAR, SPRY1	0,52	0,99	<0,001
L*	CA3, MB, OTUD1, SPARC	0,42	2,59	<0,001
a*	MB, UQCR11, LIPE	0,32	1,27	<0,001
h°	SPARC, FABP3, FOS, PPAR, MB	0,59	3,10	<0,001
LIM	HHATL, LIPE, GLOD4	0,45	0,88	<0,001
Tendreté	SPARC, ZNF24, RTP4	0,41	0,70	<0,001

Erreur : Racine carrée de l'erreur quadratique moyenne

Nos modèles ne permettent donc pas actuellement de prédire assez précisément la qualité de la viande.

La considération de classes de qualité, par exemple : très bon, satisfaisant, moyen, mauvais déterminées par des experts puis l'établissement de modèles pour classer des échantillons (carcasses ou pièces) selon ces niveaux pourrait améliorer la capacité de prédiction de la qualité.

## CONCLUSION

Notre dispositif expérimental a permis d'identifier par analyse du transcriptome musculaire de nombreux transcrits associés aux caractères de qualité technologique et sensorielle de la viande de porc. Après confirmation, nous avons validé sur des données indépendantes issues du même dispositif, 60 associations transcrit-caractère incluant 26 expressions géniques et 8 caractères de qualité ( $P<0,05$ ,  $|r|<0,68$ ). Ensuite, une validation externe réalisée sur des animaux commerciaux d'origine différente a permis de valider 19 associations ( $P<0,05$ ,  $|r|<0,49$ ) pour 7 caractères de qualité. Des modèles de régression multiple permettent d'expliquer jusqu'à 59% de la variabilité d'un caractère sur l'ensemble des données expérimentales. Toutefois leur pouvoir prédictif testé sur les animaux commerciaux est insuffisant pour envisager le développement d'outils. La considération de classes (niveaux) de qualité et de combinaisons de biomarqueurs associées pourrait permettre d'envisager le développement d'outils d'évaluation précoce p.m. des carcasses ou des pièces.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions le personnel de l'INRA UMR PEGASE ainsi que le Ligéal, les éleveurs, l'abattoir et l'industrie Oteiza partenaires de la Filière Basque, pour leur participation à ce travail. Les auteurs remercient la participation de la Communauté Européenne, 6<sup>ème</sup> PCRD, pour le Projet Intégré Q-PORKCHAINS FOOD-CT-2007-036245.

Les résultats et conclusions de cet article sont sous la seule responsabilité des auteurs et ne reflètent pas nécessairement la position de la Communauté Européenne.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Damon M., Wyszynska-Koko J., Vincent A., Héroult F., Lebret B., 2012a. Comparison of muscle transcriptome between pigs with divergent meat quality phenotypes identifies genes related to muscle metabolism and structure. PLoS ONE, 7, e33763.
- Damon M., Denieul K., Vincent A., Bonhomme N., Wyszynska-Koko J., Lebret B., 2012b. Associations between muscle gene expression pattern and technological and sensory meat traits highlight new biomarkers for pork quality assessment. Meat Sci., en révision.
- Lebret B., 2008. Effects of feeding and rearing systems on growth, carcass composition and meat quality in pigs. Animal, 2, 1548-1558.
- Lebret B., 2009. Stratégies nutritionnelles visant à moduler la croissance et la composition des dépôts tissulaires chez le porc : conséquences sur la qualité de la viande. Thèse de Doctorat, Biologie et Agronomie, Agrocampus Ouest, Rennes. 116 Pp.
- Lebret B., Damon M., Gondret F., Lefaucheur L., Louveau I., Prunier A., Bonhomme N., Ecolan P., Wyszynska-Koko J., Lepetit J., Méteau K., Barthélémy S., Pollet P.Y., Dourmad J.Y., 2011. Variation de la qualité de la viande de porc selon la race : Basque ou Large White et le système d'élevage : conventionnel, alternatif ou extensif. Journées Rech. Porcine, 43, 39-46
- Liu J., Damon M., Guitton N., Guisle I., Ecolan P., Vincent A., Cherel P., Gondret F., 2009. Differentially-expressed genes in pig Longissimus muscles with contrasting levels of fat, as identified by combined transcriptomic, reverse transcription PCR, and proteomic analyses. J. Agric. Food Chem., 57, 3808-3817.
- Lobjois, V., Liaubet, L., SanCristobal, M., Glénisson, J., Fève, K., Rallières, J., Le Roy, P., Milan D., Cherel P., Hately F., 2008. A muscle transcriptome analysis identifies positional candidate genes for a complex trait in pig. Anim. Genetics, 39, 147-162.
- Mérour I., Riendeau L., Maignel L., Rivest J., Vautier A., 2007. Comparaison de différentes méthodes de mesure du caractère exsudatif de la viande fraîche dans les populations porcines françaises et canadiennes. Journées Rech. Porcine, 39, 215-222.
- Ngapo T.M., Gariépy C., 2008. Factors Affecting the Eating Quality of Pork. Crit. Reviews Food Sci. Nut., 48, 599-633.
- Ponsuksili S., Jonas E., Murani E., Phatsara C., Srikanthai T., Walz C., Schwerin M., Schellander K., Wimmers K., 2008. Trait correlated expression combined with expression QTL analysis reveals biological pathways and candidate genes affecting water holding capacity of muscle. BMC Genomics, 9, 367.
- Rosenvold K., Andersen H.J., 2003. Factors of significance for pork quality - a review. Meat Sci., 64, 219-237.
- Sellier P., Monin G., 1994. Genetics of pig meat quality. J. Muscle Foods, 5, 187-219.
- Te Pas M.F.W., Keuning E., Hulsegge B., Hoving-Bolink A.H., Evans G., Mulder H.A.A., 2010. Longissimus muscle transcriptome profiles related to carcass and meat quality traits in fresh meat Piétrain carcasses. J. Anim. Sci., 88, 4044-4055.
- Te Pas M.F.W., Lebret B., Damon M., Thomsen B., Pierzschala M., Korwin-Kossakowska A., Li K., Kristensen L., Young J.F., Pedersen B., Oksbjerg N., 2012. Predicting meat quality with biomarkers. Fleischwirtschaft Int., 27, 18-22.