

RÉPERCUSSIONS MÉTABOLIQUES DE L'ÂGE ET DE L'ÉTAT CORPOREL CHEZ LE CHIEN

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE PAR LA TECHNIQUE DES « SIGNATURES BIOLOGIQUES »

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2005
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Béatrice, Julie MARROU
Née, le 1^{er} juillet 1981 à CAHORS (Lot)

Directeur de thèse : Mme le Docteur Nathalie PRIYMENKO

JURY

PRESIDENT :

M. Jean-Pierre LOUVET

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :

Mme Nathalie PRIYMENKO

M. Patrick VERWAERDE

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :

M. Alain PARIS

Directeur de recherche à l'INRA

Toulouse, 2005

NOM : MARROU

PRENOM : Béatrice

TITRE : Répercussions métaboliques de l'âge et de l'état corporel chez le chien. Etude expérimentale par la technique des « signatures biologiques »

RESUME :

Les signatures biologiques constituent une démarche novatrice pour l'étude des réponses métaboliques des systèmes biologiques à différents stimuli. Elle associe la spectroscopie à résonance magnétique, qui fournit une description exhaustive des métabolites présents dans les liquides biologiques, les cellules ou les tissus, à des méthodes d'analyses statistiques multivariées permettant l'investigation des contrastes biologiques.

Ces techniques sont ici appliquées à l'étude de l'évolution du métabolisme général en fonction de l'âge et de l'état corporel chez le chien. Les urines de 95 chiens mâles entiers en bonne santé sont analysées en RMN du proton. Les analyses factorielles discriminantes mettent en évidence une ségrégation significative selon l'âge. L'état d'entretien, évalué par attribution de BCS, ne semble pas affecter le profil métabolique urinaire. En revanche, l'influence d'autres facteurs intrinsèques (race) ou extrinsèques (alimentation et mode de vie) est révélée.

MOTS-CLEFS : métabolisme, résonance magnétique nucléaire, urine, chien, âge, état corporel, race canine

ENGLISH TITLE : Application of $^1\text{H-NMR}$ based metabonomic techniques for the analysis of biochemical effects of age and body condition on dog urine profile

ABSTRACT :

Metabonomics are defined as a system of approach to the multivariate investigation of the dynamic biological response to pathophysiological or genetic stimuli. These procedures, utilizing nuclear magnetic resonance spectroscopy, provide quantitative description of endogenous metabolites present in a biological sample such as biofluids, cells or tissues. Then, discriminations can be revealed by different data variance analysis.

In this study, $^1\text{H-NMR}$ based metabonomics are used to investigate biochemical variation in relation to animal ageing or body condition fluctuations. Urines from 95 healthy male dogs are collected by natural micturition. Pattern recognition analyses enable the detection of age related variation while BCS doesn't seem to affect the metabolite profiles. This technique also reveals differences between breeds and effects of diet and activity.

KEY-WORDS : metabolism, nuclear magnetic resonance, urine, dog, age, body condition, breed

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur	: M.	A. MILON
Directeurs honoraires	M.	G. VAN HAVERBEKE
	M.	J. FERNEY
Professeurs honoraires	M.	L. FALIU
	M.	C. LABIE
	M.	C. PAVAU
	M.	F. LESCURE
	M.	A. RICO
	M.	D. GRIESS
	M.	A. CAZIEUX
	Mme	V. BURGAT
	M.	J. CHANTAL
	M.	J.-F. GUELF
	M.	M. EECKHOUTTE

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- M. **CABANIE Paul**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **DARRE Roland**, *Productions animales*
- M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **HENROTEAUX Marc**, *Médecine des carnivores*
- M. **MARTINEAU Guy-Pierre**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

PROFESSEURS 2^e CLASSE

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
- M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **KOLF-CLAUW Martine**, *Pharmacie - Toxicologie*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*

INGENIEUR DE RECHERCHES

- M. **TAMZALI Youssef**, *Responsable Clinique équine*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAÎTRE DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. JOUGLAR Jean-Yves, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

MAÎTRE DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

M. ASIMUS Erik, *Pathologie chirurgicale*
M. BAILLY Jean-Denis, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. BERGONIER Dominique, *Pathologie de la Reproduction*
M. BERTAGNOLI Stéphane, *Pathologie infectieuse*
Mme BOUCRAUT-BARALON Corine, *Pathologie infectieuse*
Mlle BOULLIER Séverine, *Immunologie générale et médicale*
Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. BOUSQUET-MELOU Alain, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme BRET-BENNIS Lydie, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. BRUGERE Hubert, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
Mlle CADIERGUES Marie-Christine, *Dermatologie*
Mme CAMUS-BOUCLAINVILLE Christelle, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mme COLLARD-MEYNAUD Patricia, *Pathologie chirurgicale*
Mlle DIQUELOU Armelle, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. DOSSIN Olivier, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie du bétail*
Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. GUERIN Jean-Luc, *Elevage et Santé Avicoles et Cunicoles*
Mme HAGEN-PICARD Nicole, *Pathologie de la Reproduction*
M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. JAEG Jean-Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
M. LYAZRHI Faouzi, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. MAREDA Marc, *Pathologie de la reproduction*
M. MATHON Didier, *Pathologie chirurgicale*
M. MEYER Gilles, *Pathologie des ruminants*
Mme MEYNADIER-TROEGELER Annabelle, *Alimentation*
M. MONNEREAU Laurent, *Anatomie, Embryologie*
Mme PRIYMENKO Nathalie, *Alimentation*
Mme RAYMOND-LETRON Isabelle, *Anatomie pathologique*
M. SANS Pierre, *Productions animales*
Mlle TRUMEL Catherine, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. VERWAERDE Patrick, *Anesthésie, Réanimation*

MAÎTRE DE CONFERENCES CONTRACTUELS

Mlle BIBBAL Delphine, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. CASSARD Hervé, *Pathologie du bétail*
M. DESMAIZIERES Louis-Marie, *Clinique équine*
M. NOUVEL Laurent-Xavier, *Pathologie de la reproduction*

MAÎTRE DE CONFERENCES ASSOCIE

M. REYNOLDS Brice, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

M. CONCHOU Fabrice, *Imagerie médicale*
M. CORBIERE Fabien, *Pathologie des ruminants*
Mlle LACROUX Caroline, *Anatomie pathologique des animaux de rente*
M. MOGICATO Giovanni, *Anatomie, Imagerie médicale*
Mlle PALIERNE Sophie, *Chirurgie des animaux de compagnie*

A notre président de thèse,

Monsieur le Professeur Jean-Pierre LOUVET
Professeur des Universités
Praticien hospitalier
Endocrinologie et métabolisme

qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury.
Hommages respectueux.

Aux membres de notre jury de thèse,

Madame le Docteur Nathalie PRIYMENKO
Maître de Conférence de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Alimentation

qui nous a confié ce travail et qui, par son appui bienveillant et ses conseils, nous a permis de le mener à bien.
Qu'elle trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

Monsieur le Docteur Patrick VERWAERDE
Maître de Conférence de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Anesthésie - Réanimation

qui a aimablement accepté de participer à notre jury,
Sincères remerciements.

Les travaux présentés dans le volet expérimental ont fait l'objet d'un stage au sein de l'unité des Xénobiotiques INRA de Toulouse.

Je remercie chaleureusement tous les membres du laboratoire qui m'ont aidée dans la réalisation de ce travail, particulièrement M. Alain Paris pour m'avoir initiée à la recherche avec patience.

J'adresse également mes plus vifs remerciements à Cécile Canlet, qui a encadré les analyses en RMN, à Gaëlle, sans qui les statistiques seraient encore à mes yeux un langage ésotérique, ainsi qu'à Céline et Sandrine, stagiaires en master, qui m'ont amicalement accueillie et entourée de leurs conseils.

A ma petite mémé,

*qui rêve depuis longtemps
de voir « Petit véto » devenu grand.*

A ma mère,

*si dévouée et si aimante,
à chaque appel toujours présente.*

A mon père,

*agriculteur qui le premier
m'a donné goût de ce métier.*

A ma soeur Hélène,

*à nos fous rires, nos confidences,
à la complicité qui nous lie depuis d'enfance.*

Aux amis qui ont partagé ces cinq années toulousaines,

Caro, Nabou, Nom, Manue, Amélie et tant d'autres,
Agilitistes de « TVA »...

*que nos chemins qui aujourd'hui s'éloignent
à nouveau se croisent ou se rejoignent...*

A tous ceux qui me liront et me reconnaîtront...

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	11
TABLE DES ILLUSTRATIONS	15
LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS UTILISEES	17
INTRODUCTION.....	19
PARTIE 1 : LES « SIGNATURES BIOLOGIQUES » : PRINCIPES, APPLICATIONS, PERSPECTIVES	21
Les sciences en « -omique », de nouvelles approches des systèmes biologiques.....	21
Les sciences en « -omique », présentation	21
La génomique	21
La protéomique.....	22
La métabolomique et la métabonomique.....	22
Intérêt relatif et complémentarité de ces différentes techniques.....	23
Procédés d'obtention des signatures biologiques	25
Description des échantillons : spectroscopie RMN	25
Principes fondamentaux de la spectroscopie RMN.....	25
Discrétisation des spectres.....	30
Représentation des données : analyses statistiques multivariées.....	31
L'analyse en composantes principales	31
L'analyse factorielle discriminante	32
Applications des signatures biologiques par spectroscopie RMN.....	35
Supports biologiques et techniques	35
Spectroscopie RMN de liquides biologiques	35
Spectroscopie RMN de tissus <i>in vitro</i>	36
Spectroscopie RMN de tissus <i>in vivo</i>	36
Domaines d'application	37

Toxicologie et pharmacologie.....	37
Recherche biomédicale et diagnostic clinique	38
PARTIE 2 : PARTIE EXPERIMENTALE.....	41
Objectifs.....	41
Matériel et méthodes	42
Sujets	42
Critères d'inclusion et d'exclusion.....	42
Identification des animaux, recueil des informations	42
Réalisation des prélèvements.....	43
Préparation des échantillons et spectroscopie RMN.....	44
Analyses statistiques.....	45
Tests du Chi 2.....	45
Analyses statistiques multivariées.....	47
Résultats	48
Caractérisation de l'échantillon.....	48
Répartition en fonction de l'âge.....	48
Races représentées	49
Etat corporel	50
Activité et mode de vie.....	54
Alimentation.....	56
Etude des profils métaboliques : identification des sources de variation	58
Evolution avec l'âge des profils métaboliques.....	58
Influence de l'état corporel sur les profils métaboliques	61
Ségrégation selon la race.....	62
Effets de l'alimentation	65
Effets du mode de vie.....	67
Identification des principaux composés différenciant les spectres	69
Analyse des spectres	69
Composés correspondant aux variables sélectionnées en AFD.....	72
Discussion	78
Critères d'inclusion : restriction aux chiens mâles entiers.....	78
Etat corporel des chiens de l'échantillon	79
Proportion de chiens obèses.....	79
Proportion de chiens maigres.....	79
Influence des facteurs externes	80
Méthode de collecte	81
Analyses spectroscopiques et statistiques	81
Interprétation des résultats des AFD	82

Effet de l'âge	82
BCS	84
Races	84
Alimentation	85
Mode de vie	86
CONCLUSION	89
BIBLIOGRAPHIE	91
ANNEXES	99
Annexe 1 : "Body Condition Score" System (Laflamme, 1997).....	99
Annexe 2 : Récapitulatif des prélèvements.....	100
Légende	100
Age en classe	100
Activité.....	100
Alimentation	100
Annexe 3 : Répartition des chiens en fonction de la race, de l'âge, de l'état corporel et de l'activité	104
Annexe 4 : Correspondance « Déplacement chimique » – « Composés » (d'après données bibliographiques)	105
Annexe 5 : Résultats d'études épidémiologiques sur l'état corporel de chiens et comparaison avec les résultats de cette étude.	107
Surpoids et obésité	107
Prévalence des excès pondéraux en fonction du sexe.....	107
Etats corporels insuffisants	107
Annexe 6 : Voies métaboliques évoquées	108
a. Cycle de Krebs, entrée des acides aminés glucoformateurs	108
b. Métabolisme azoté.....	109
c. Métabolisme de la choline.....	110

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure 1 : Relations entre le génome et les différentes techniques d'évaluation de l'expression génique (transcriptomique), des synthèses protéiques (protéomique) et du profil en métabolites (métabonomique) (d'après Lindon <i>et al.</i> , 2003).....	23
Figure 2 : Echelles de déplacement chimique du proton pour $B_0 = 9.4$ Tesla (fréquence de résonance du proton 400 MHz) (d'après Canet <i>et al.</i> , 2002).....	29
Figure 3 : Dédoublage du signal de deux protons voisins en spectroscopie RMN 1H	29
Figure 4 : Techniques et procédures en métabonomique (d'après Nicholson <i>et al.</i> , 2002).....	34
Figure 5 : Représentation de l'âge des chiens utilisés dans l'expérience.....	48
Figure 6 : Poids corporel relatif en fonction du BCS attribué.....	50
Figure 7 : Répartition des âges des chiens au sein des niveaux d'état corporels.....	51
Figure 8 : Représentativité des races au sein des niveaux d'état corporel.....	52
Figure 9 : Effectifs par races selon chaque activité.....	54
Figure 10 : Délai depuis le dernier repas en fonction de l'âge des chiens.....	57
Figure 11 : ACP des animaux.....	59
Figure 12 : Séparation des classes d'âge par AFD.....	60
Figure 13 : Représentation des groupes d'état corporel par AFD.....	61
Figures 14 et 15 : Représentation des groupes raciaux par AFD.	63
Figure 16 : Ségrégation selon l'alimentation par AFD (tous les chiens).....	65
Figures 17 et 18 : Ségrégation selon l'alimentation par AFD en retirant le groupe « carcasses de canard ».	66
Figure 19 : Ségrégation selon le mode de vie par AFD.	68
Figure 20 : Spectre d'urines de chiens en spectroscopie RMN du proton 1H	71

Tableaux

Tableau 1 : Nombre de spin, rapport gyromagnétique et abondance naturelle des isotopes les plus utilisés en spectroscopie RMN	27
Tableau 2 : Effectifs des différentes races et répartition par classe d'âge.....	49
Tableau 3 : Etats corporels selon la race.	53
Tableau 4 : Etat corporel en fonction de l'activité.....	55
Tableau 5 : Aliment distribué en fonction de l'activité et de l'état corporel.	57
Tableau 6 : Effectifs des différentes classes d'âge.....	59
Tableau 7 : Carrés des distances de Mahalanobis entre les classes d'âge.	60

Tableau 8 : Significativité (probabilités) des distances de Mahalanobis entre les classes d'âge.	60
Tableau 9 : Effectifs des niveaux d'états corporels.....	61
Tableau 10 : Significativité (probabilités) des distances de Mahalanobis entre les groupes d'état corporels.	62
Tableau 11 : Effectifs des groupes raciaux retenus.	62
Tableau 12 : Carré des distances de Mahalanobis entre les groupes raciaux.	64
Tableau 13 : Significativité (probabilités) des distances de Mahalanobis entre les groupes raciaux.....	64
Tableau 14 : Effectifs des groupes de chiens recevant le même type d'alimentation.....	65
Tableau 15 : Significativité (probabilités) des distances de Mahalanobis entre les groupes de chiens recevant le même type d'alimentation.....	67
Tableau 16 : Effectifs des groupes de chiens en fonction du mode de vie.....	67
Tableau 17 : Significativité (probabilités) des distances de Mahalanobis entre les groupes de chiens de mode de vie identique.	68
Tableau 18 : Variables les plus importantes pour chacun des deux axes principaux de l'AFD réalisée avec les classes d'âge.....	73
Tableau 19 : Variables les plus importantes pour chacun des deux axes principaux de l'AFD réalisée avec les groupes raciaux.	74
Tableau 20 : Variables les plus importantes selon l'axe 1 de l'AFD réalisée avec les groupes de chiens recevant la même alimentation.	75
Tableau 21 : Variables les plus importantes selon l'axe 1 et 3 de l'AFD réalisée avec les groupes de chiens recevant la même alimentation et pour laquelle on a retiré groupe des chiens nourris avec des carcasses de canard.....	75
Tableau 22 : Variables les plus importantes pour chacun des trois premiers axes de l'AFD réalisée à partir des groupes de chien avec un mode de vie similaire	76

Liste des principales abréviations utilisées

- § **ACP** : Analyse en Composantes Principales
- § **AFD** : Analyse Factorielle Discriminante
- § **ANOVA** : analyse de variance (ANalysis Of VAriance)
- § **BCS** : score d'état corporel (Body Condition Score)
- § **COMET** : Consortium on Metabonomic Toxicology
- § **df** : degré de liberté (degree of freedom)
- § **ENVT** : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
- § **HPLC** : chromatographie en phase liquide à haute résolution (High Performance Liquid Chromatography)
- § **3-HPPA** et **4-HPPA** : acide 3-hydroxyphénylpropionique et acide 4-hydroxyphénylpropionique
- § **IRM** : Imagerie par Résonance Magnétique
- § **LD** : axe discriminant (Linear Discriminant)
- § **MAS–NMR** : spectroscopie par résonance magnétique nucléaire avec rotation de l'échantillon à l'angle magique (Magic Angle Spinning–Nuclear Magnetic Resonance)
- § **MS** : spectrométrie de masse (Mass Spectrometry)
- § **RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire
- § **TMSP** : propionate de triméthylsilyl

Introduction

Le vieillissement de l'animal s'accompagne du développement progressif de maladies chroniques (insuffisances organiques diverses, arthrose...). L'apparition de certaines de ces maladies dégénératives est retardée chez les animaux dont l'état d'embonpoint est régulé. Ainsi, des expériences, conduites sur des paires de chiens issus de mêmes portées et dont un subissait une restriction alimentaire, ont montré une augmentation significative de l'espérance de vie dans ce cas, les causes de mortalité demeurant identiques (Kealy *et al.*, 2002 ; Lawler *et al.*, 2005).

De fait, on peut s'interroger sur les perturbations métaboliques survenant au cours de l'avancée en âge de l'organisme et sur l'influence de l'état corporel sur ces processus.

L'appréhension de cette évolution du métabolisme général pourrait être facilitée par l'utilisation des procédés de « signatures biologiques ». Celles-ci sont basées sur l'analyse d'échantillons biologiques – comme l'urine, le plasma ou les tissus - par des techniques telles que la spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN), couplée à des études statistiques. Elles permettent d'obtenir une description quantitative et sans *a priori* des métabolites endogènes présents dans le milieu étudié.

Les signatures biologiques constituent ainsi un système d'approche des réponses métaboliques à différents stimuli, particulièrement intéressant pour les études de toxicité de xénobiotiques ou de processus pathologiques (Nicholson *et al.*, 1999).

L'objet de ce travail sera de comprendre ces méthodes, d'en évaluer l'intérêt puis de les appliquer pour obtenir des profils métaboliques à partir d'urines, issues de chiens d'âge et d'état corporel variable, vivant en conditions non expérimentales, avec toutes les variations que l'on rencontre au sein de cette espèce tant sur le plan racial qu'environnemental.

Nos objectifs seront multiples. Nous chercherons à apporter des éléments de réponse concernant l'influence de l'âge et de l'état corporel sur le métabolisme général. Par ailleurs, le maximum de paramètres concernant les chiens et leur environnement seront relevés afin d'identifier, parmi la grande variété des facteurs intrinsèques (races) ou extrinsèques (alimentation, activité) pouvant perturber les profils métaboliques, des sources de variations prépondérantes.

En première partie, une synthèse bibliographique permettra de faire le point sur les nouvelles approches des systèmes biologiques par la génomique, la protéomique et la métabonomique, puis les procédés d'obtention des signatures biologiques (spectroscopie par résonance magnétique et analyses statistiques multivariées) et leurs utilisations seront détaillées. La deuxième partie se rapportera à l'expérimentation réalisée sur 95 chiens en vue de caractériser l'influence de différents paramètres sur le métabolisme général et leur signification.

Partie 1 : Les « signatures biologiques » : principes, applications, perspectives

Les sciences en « -omique », de nouvelles approches des systèmes biologiques

Les sciences en « -omique », présentation

Le développement de nouveaux outils en biologie moléculaire a conduit en quelques années à une connaissance croissante de l'organisation du génome. Après le séquençage du génome de nombreux organismes inférieurs, un effort énorme a été fait afin de déterminer la totalité de la séquence de celui de l'homme, ouvrant de nouvelles perspectives pour la recherche pharmaceutique. Néanmoins, il est de plus en plus évident que cette connaissance de la séquence génomique ne permet pas en elle-même l'explication de la nature fondamentale des processus physiopathologiques, ce qui se traduit par un intérêt croissant pour des approches liant l'expression génique et phénotypique (Nicholson *et al.*, 1999 ; Nicholson *et al.*, 2002 ; Lindon *et al.*, 2003).

Plusieurs techniques ont été développées pour essayer de comprendre le fonctionnement des systèmes biologiques intégrés. Les termes de « génomique », « protéomique » puis « métabolomique » et « métabonomique » ont ainsi fait leur apparition pour désigner des méthodes d'évaluation semi-quantitative de l'expression génique, des synthèses protéiques ou des réponses métaboliques.

La génomique

Le concept de « génomique » ou « transcriptomique » fait référence à une évaluation semi-quantitative de l'expression génique. L'approche génomique s'intéresse à l'étude de l'expression

différentielle de gènes secondairement à une modification génétique, à un état pathologique ou à l'exposition à un toxique.

Les techniques employées mettent en œuvre des puces à ADN (« *gene chips* » en anglais) qui sont de petits dispositifs à usage unique, encodés avec une combinaison de gènes, sur lesquels vont se fixer par complémentarité les ARNm cellulaires isolés de cellules soumises à des situations particulières. De nombreux gènes peuvent être placés sur ces puces, permettant de déterminer rapidement et de façon semi-quantitative, l'ensemble des gènes activés par le processus étudié.

Le principal inconvénient de ce procédé reste son coût élevé. De plus, malgré les progrès réalisés en matière de connaissance du génome, les relations entre l'expression génique et les systèmes de contrôle cellulaire demeurent mal compris du fait de l'existence de séquences d'ADN non codant et/ou adjacent à un gène pour son expression (Lindon *et al.*, 2001).

La protéomique

La recherche en biologie moléculaire s'intéresse également à la protéomique, mesure semi-quantitative de la production de protéines cellulaires en réponse à un stimulus toxique ou pathologique. Le terme de « protéome » désigne, par analogie au « génome », l'ensemble des protéines synthétisées par un organisme.

De nombreuses techniques sont employées, notamment la séparation des protéines par électrophorèse en gel à deux dimensions combinée à l'identification chimique des composés par spectrométrie de masse. Ces procédés, moins onéreux que ceux utilisés en génomique, restent lourds à mettre en œuvre.

Les études protéomiques sont intéressantes pour détecter des biomarqueurs de maladies ou pour identifier des cibles moléculaires en toxicologie. Leur intérêt est limité par l'incapacité des techniques actuelles à appréhender les variations du protéome au cours du temps et par la focalisation des analyses sur un organe unique alors que plusieurs tissus peuvent être mis en jeu par un même processus toxique (Lindon *et al.*, 2001).

La métabolomique et la métabonomique

Une troisième classe d'information vient compléter les notions de génome et protéome. La métabonomique (ou méthode des « signatures biologiques ») correspond à l'évaluation quantitative et dynamique des réponses métaboliques multiparamétriques des systèmes biologiques aux stimuli physiopathologiques et aux modifications géniques (Nicholson *et al.*, 1999).

L'obtention de données métabonomiques repose sur des méthodes spectrométriques (en particulier la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire à haute résolution), fournissant une description exhaustive des métabolites présents dans les liquides biologiques, les cellules ou les tissus, associées avec des méthodes d'analyses statistiques multivariées, permettant la mise en évidence de "contrastes" biologiques.

Une distinction est à établir entre la notion de métabolome qui fait référence à l'ensemble des métabolites contenu dans un type cellulaire donné et la métabonomique, qui correspond à l'identification et à la quantification des perturbations du profil métabolique, engendrées par des processus biologiques, au sein d'un système intégré (Nicholson *et al.*, 2002).

Intérêt relatif et complémentarité de ces différentes techniques

Dans les organismes complexes, les niveaux d'organisation biomoléculaire (génomique, protéomique, métabonomique) sont interdépendants et fluctuent en fonction de facteurs environnementaux et de stress (Figure 1).

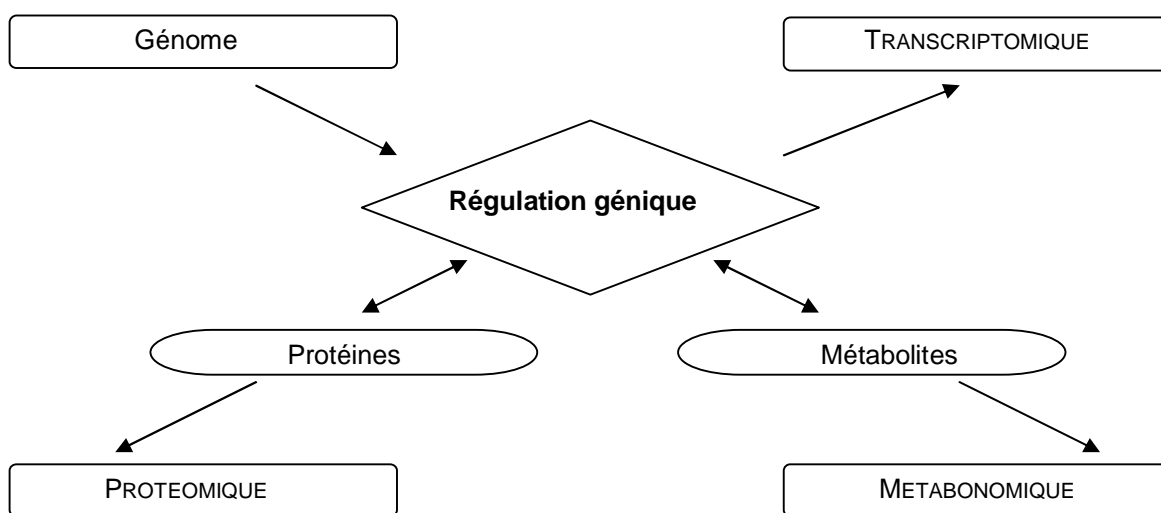


Figure 1 : Relations entre le génome et les différentes techniques d'évaluation de l'expression génique (transcriptomique), des synthèses protéiques (protéomique) et du profil en métabolites (métabonomique) (d'après Lindon *et al.*, 2003).

Ainsi, le développement d'une maladie ou l'administration d'un xénobiotique peut engendrer des variations à différents niveaux, de l'expression génique aux mécanismes moléculaires de régulation cellulaire. Dans de telles situations, des perturbations pourront être détectées au niveau transcriptomique, protéomique et métabonomique.

Néanmoins, certains xénobiotiques agissent seulement sur le plan pharmacologique et ne touchent pas l'expression génique ou les synthèses protéiques. La seule considération des données génomiques et protéomiques peut alors s'avérer insuffisante pour prévoir l'évolution de la maladie ainsi que l'efficacité ou la toxicité du xénobiotique. Par contre, les processus pathologiques ou les toxiques sont tous responsables de perturbations des concentrations et des flux des métabolites impliqués dans les mécanismes cellulaires clefs. L'ajustement de l'environnement intra et extracellulaire visant à maintenir un milieu interne constant s'exprime par une « empreinte » des perturbations biochimiques, caractéristique de la nature du processus pathologique ou du site d'action toxique. Aussi, la composition des liquides biologiques est constamment modifiée et révèle des réponses subtiles à la toxicité ou aux maladies (Nicholson *et al.*, 2002 ; Lindon *et al.* 2003).

En résumé, la génomique et la protéomique caractérisent les effets potentiels des processus pathologiques ou toxiques, tandis que la métabonomique s'intéresse aux effets directs.

La démarche biologique s'oriente vers des approches intégratives (génomique > protéomique > métabonomique) permettant de décrire un organisme en fonctionnement, donc faisant une large part à l'étude du métabolisme.

Les signatures biologiques se définissent comme l'interprétation des réponses des organismes vivants à des perturbations physiopathologiques grâce à une analyse multivariée de données biologiques issues du métabolisme.

Ces approches sont facilitées par des techniques permettant l'acquisition en parallèle de très grands nombres de descripteurs et la disponibilité d'outils informatiques rendant possible le stockage de ces données et l'analyse d'un très grand nombre de variables. Ces techniques feront l'objet du paragraphe suivant.

Description des échantillons : spectroscopie RMN

La métabonomique permet d'appréhender le métabolisme général grâce à une méthodologie développée durant les années 1990 impliquant une nouvelle génération d'instruments permettant d'observer le métabolisme sans *a priori* sur les variations attendues (description tous azimuts de l'échantillon).

L'obtention de telles données passe par des approches analytiques non sélectives mais spécifiques. Différentes méthodes de spectroscopie peuvent produire des signatures métaboliques comme la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire, la spectrométrie de masse (MS), la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GS/MS), la chromatographie en phase liquide à haute résolution (High Performance Liquid Chromatography – HPLC) couplée à une détection par les ultraviolets ou les techniques de spectroscopie optique.

Sur le plan bioanalytique, la RMN et la MS sont deux techniques génératrices de données métaboliques multidimensionnelles très puissantes et complémentaires. La spectroscopie de masse, qui repose sur la séparation de formes ionisées selon leur rapport masse/charge (m/z) à l'aide d'un champ électrique, a été beaucoup utilisée car sa sensibilité est globalement plus grande que celle de la RMN. Elle nécessite cependant une séparation préalable des molécules par chromatographie en phase gazeuse ou liquide. A l'inverse, la RMN est directement applicable à l'étude de milieux moléculaires complexes. Elle n'endommage pas les échantillons et constitue la seule technique permettant d'analyser des tissus intacts (Nicholson *et al.*, 2002).

Principes fondamentaux de la spectroscopie RMN

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire est basée sur la mesure de l'absorption d'ondes électromagnétiques dans le domaine des fréquences radio qui s'étend approximativement de 4 à 1000 MHz.

En effet, un certain nombre de noyaux – notamment le proton (^1H), le carbone 13 (^{13}C) ou le phosphore 31 (^{31}P), trois noyaux parmi les plus représentés dans les macromolécules du vivant – possèdent des propriétés magnétiques. Lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique intense,

ces noyaux sont capables, via ce que l'on appelle leur spin, d'absorber de l'énergie et d'entrer en résonance (Canet *et al.*, 2002).

Principes physiques

Spin nucléaire

La structure des spectres RMN provient de l'étagement des niveaux d'énergie du système de spin nucléaire. Protons et neutrons possèdent, comme les électrons, un spin (moment angulaire intrinsèque, dont on dit parfois qu'il est associé à la rotation de la particule sur elle-même).

La contribution collective des nucléons engendre un moment cinétique intrinsèque pour le noyau. Ce spin est caractérisé par un nombre ℓ , entier ou demi-entier, appelé nombre de spin, qui permet de définir le nombre des états distincts dans lequel le spin peut se trouver. En effet, la composante ℓ_z du spin nucléaire suivant une direction de référence z est quantifiée et ne peut prendre que certaines valeurs définies par l'équation :

$$\ell_z = m_\ell \cdot \frac{h}{2\pi}$$

où m_ℓ , nombre quantique magnétique de spin, peut prendre les valeurs $\frac{1}{2}$, $(\ell-1)$, et ℓ .

Par exemple, le nombre de spin du proton, du neutron ou de l'électron est égal à $\frac{1}{2}$: il existe pour ces particules deux états de spin correspondant à $m_\ell = -\frac{1}{2}$ et $m_\ell = +\frac{1}{2}$.

Le spin nucléaire dépend de la forme spatiale, de la charge du noyau et du nombre de nucléons : si le nombre de masse A est impair, le spin nucléaire est un demi entier. Si le nombre de masse A et la charge Z sont pairs, le spin est nul. Si le nombre de masse A est pair et la charge Z impaire, le spin est un entier.

Moment magnétique

La rotation sur elle-même d'une particule crée un champ magnétique dont le moment magnétique μ est colinéaire au spin :

$$\mu = \gamma \cdot \frac{h}{2\pi} \cdot \ell_z$$

avec h la constante de Planck ($h = 1,054 \cdot 10^{-34}$ J.s)

La constante γ , caractéristique de chaque isotope, est appelée rapport gyromagnétique et s'exprime en $\text{radian} \cdot \text{Tesla}^{-1} \cdot \text{seconde}^{-1}$ ($\text{rad} \cdot \text{T}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), le Tesla étant l'unité de mesure d'induction magnétique. Le nombre de spin ainsi que le rapport gyromagnétique des isotopes les plus souvent utilisés sont donnés dans le tableau 1.

Isotope	Spin ℓ	Rapport gyromagnétique γ (rad.T ⁻¹ .s ⁻¹)	Abondance naturelle de l'isotope (%)
¹ H	½	26,75.10 ⁷	99,8
³¹ P	½	10,83.10 ⁷	100
¹³ C	½	6,72.10 ⁷	1,11
¹⁴ N	1	1,93.10 ⁷	99,6
¹⁹ F	½	25,16.10 ⁷	100

Tableau 1 : Nombre de spin, rapport gyromagnétique et abondance naturelle des isotopes les plus utilisés en spectroscopie RMN

Phénomène de résonance

Un spin $\ell = \frac{1}{2}$ peut être comparé à une aiguille aimantée. Placé dans un champ magnétique \vec{B}_0 , il peut présenter deux états et s'orienter soit parallèlement au champ magnétique (position la plus stable), soit antiparallèlement (position la moins stable).

L'écart d'énergie entre ces deux positions se calcule à partir de l'énergie d'interaction $-\vec{\mu} \cdot \vec{B}_0$ et est égale à :

$$\Delta E = \gamma \cdot \frac{h}{2\pi} \cdot B_0$$

La transition du niveau le moins stable vers le niveau le plus stable est possible si le système est soumis à une radiation électromagnétique de fréquence adéquate. Cette absorption d'énergie, amplifiée et enregistrée, est à la base de la spectroscopie RMN.

L'énergie portée par les radiations électromagnétique obéit à la relation de Bohr $\Delta E = h \cdot \nu$. Aussi, la fréquence ν_0 , dite fréquence de résonance, à laquelle a lieu la transition est définie par la relation :

$$\nu_0 = \frac{\gamma \cdot B_0}{2\pi}$$

Elle est donc proportionnelle à l'intensité du champ magnétique appliqué \vec{B}_0 .

Structure des spectres : déplacement chimique et couplage spin-spin

La seule considération des nombres de spin nucléaire et des moments magnétiques ne suffit pas pour expliquer la structure du spectre RMN d'une molécule. En effet, avec des noyaux parfaitement isolés, une seule fréquence de résonance serait détectée, ce qui, *a priori*, ne serait pas très intéressant.

En fait, la fréquence de résonance dépend de l'intensité du champ magnétique appliqué et de la nature du noyau, mais aussi de l'environnement chimique, ce qui engendre des signaux interprétables en termes structuraux. Deux propriétés doivent ainsi être prises en considération : le

phénomène de déplacement chimique, responsable de la séparation d'ensembles de pics en " massifs " correspondant aux différents groupements de la molécule, et le couplage spin-spin, à l'origine de la structure fine de chaque massif.

Coefficient d'écran et déplacement chimique

Le nuage électronique local peut apporter un effet perturbateur sur le champ B_0 appliqué extérieurement à l'échantillon, se traduisant au niveau du noyau par une valeur de champ légèrement différente, égale à $[B_0 \cdot (1-\sigma)]$ où σ , nombre sans dimension, est appelée coefficient d'écran.

La prise en considération de la constante d'écran conduit à une différenciation des fréquences de résonance en fonction de l'environnement électronique du noyau étudié donc de la nature du groupement chimique auquel il appartient. Ainsi, la fréquence de résonance devient :

$$\nu = \frac{\gamma \cdot (1-\sigma) \cdot B_0}{2\pi} = (1-\sigma) \cdot \nu_0$$

Cet effet reste léger (σ est de l'ordre de 10^{-6}) et ne peut être observé qu'au moyen d'un champ B_0 très homogène dans le volume utile de l'échantillon : on corrige donc l'inhomogénéité naturelle de ce champ au moyen de bobines annexes (appelés shims en anglais) qui produisent des champs correctifs.

Les constantes d'écran ne sont pas mesurées. On préfère déterminer des différences de constante d'écran entre les noyaux d'une molécule servant de référence (notée σ_{ref}) et ceux de l'échantillon observé ($\sigma_{éch}$) selon la relation :

$$\delta = (\sigma_{ref} - \sigma_{éch}) \cdot 10^6$$

δ est appelé déplacement chimique et s'exprime en particules par million (ppm).

Le déplacement chimique est caractéristique de l'environnement électronique, donc de la fonction chimique, dans lequel est impliqué le noyau considéré. Dans la pratique, il est mesuré par une différence de fréquence $\Delta\nu$ entre le signal de l'échantillon (de fréquence $\nu_{éch}$) et le signal d'une référence (de fréquence de résonance ν_{ref}). En écrivant $(\sigma_{ref} - \sigma_{éch})$ en fonction des fréquences de résonance, on obtient :

$$\delta = \frac{\nu_{éch} - \nu_{ref}}{\nu_0} \cdot 10^6$$

avec ν_0 , la fréquence de résonance théorique pour l'échantillon considéré.

Traditionnellement, les spectres sont représentés de sorte que les fréquences soient croissantes de la droite vers la gauche (Figure 2). La référence utilisée est une substance étalon dissoute dans

l'échantillon (référence dite interne) : on utilise couramment le TMS (tétraméthylsilane $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$) qui produit un pic unique à une extrémité du spectre, pour la RMN du proton.

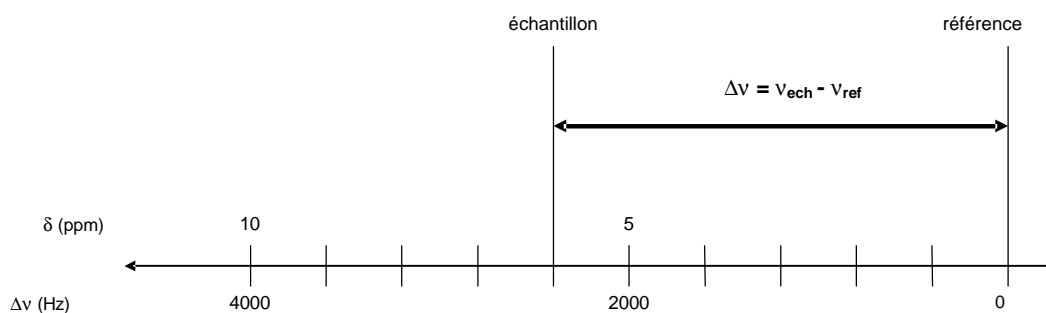


Figure 2 : Echelles de déplacement chimique du proton pour $B_0 = 9.4$ Tesla (fréquence de résonance du proton 400 MHz) (d'après Canet *et al.*, 2002).

Couplage spin-spin

Les structures fines qui apparaissent sur les spectres sont attribuées à des interactions intramoléculaires entre spins nucléaires. Cette interaction s'établit via les spins des électrons de liaison : on parle de couplage indirect ou de couplage J . Ces couplages sont responsables de dédoublements de la résonance des atomes en une succession de raies distinctes dite « multiplet ».

Pour schématiser ce processus, considérons la formation du signal de deux hydrogènes voisins (H_A et H_X), situés sur des carbones adjacents, en RMN du proton. Deux configurations (parallèle ou antiparallèle) peuvent être envisagées pour les spins des protons A et X. A chacune de ces situations va être associé, pour H_A et H_X , un léger déplacement des fréquences de résonance par rapport à ν_A et ν_X , ou apparaîtraient les signaux s'il n'existait aucun couplage entre les deux protons. Ceci entraîne l'apparition, pour chaque proton, d'un « doublet » d'écartement J_{AX} (Figure 3). Le couplage J est indépendant de B_0 et s'exprime en hertz. Il diminue lorsque la distance entre les noyaux considérés augmente.

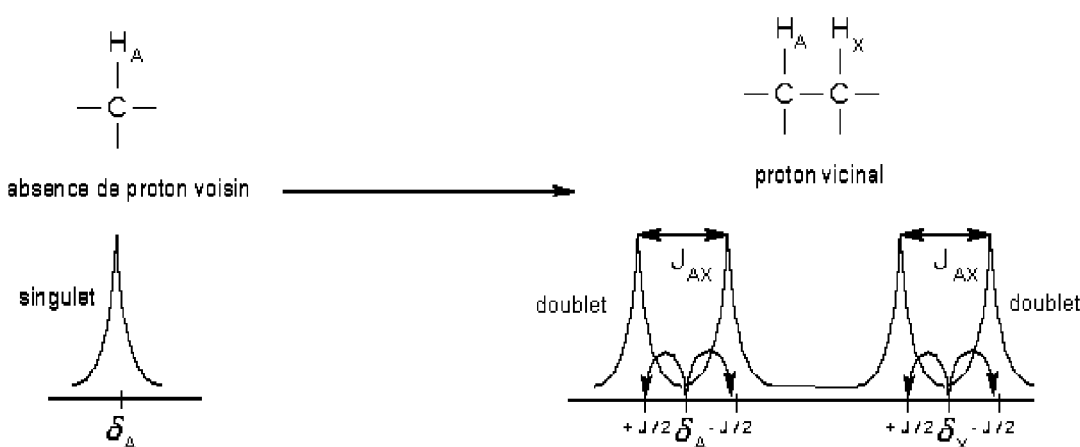


Figure 3 : Dédoublément du signal de deux protons voisins en spectroscopie RMN ^1H .

δ_A et δ_X , déplacements chimiques des signaux de résonance des protons H_A et H_X isolés ; J_{AX} écartement entre les deux éléments des doublets de résonance des protons H_A et H_X lorsqu'ils sont couplés.

D'une manière plus générale, le signal d'un noyau X couplé avec n noyaux de spin $\frac{1}{2}$ apparaît sous la forme d'un multiplet à n+1 branches.

Discrétisation des spectres

L'analyse en spectroscopie RMN de liquides biologiques – urine, plasma ou liquide céphalorachidien – ou de produits d'extraction tissulaire conduit à l'obtention de spectres complexes comportant des milliers de pics. La distribution et l'intensité de ces pics sont déterminées par les concentrations relatives de solutés et, dans certains cas, par leurs interactions moléculaires.

En fonction des rôles biologiques qu'ils remplissent, la composition des échantillons analysés varie au cours du temps : chaque échantillon biologique est caractérisé à un instant t par une "empreinte" en RMN.

La mesure traditionnelle des principaux signaux de résonance magnétique peut être utilisée pour détecter des changements biochimiques mais la complexité des spectres et la présence de variations naturelles rendent difficile la détection *de visu* des variations. Ainsi, il est en général nécessaire d'utiliser des techniques de réduction des données puis d'analyses statistiques multivariées afin d'accéder aux perturbations spectrales significatives.

La réduction des données passe par une discrétisation des spectres, c'est-à-dire leur traduction en une série de valeurs discrètes pouvant être comparées par des analyses statistiques. Pour cela, l'aire sous la courbe spectrale peut être divisée en 250 à 1000 portions d'intégrations successives correspondant à des intervalles de déplacement chimique de quelques dixièmes de ppm.

Par ailleurs, le plus souvent, dans les études métabonomiques, seule la concentration relative des différents composés est importante. Aussi, des valeurs d'intégrales relatives (rapport entre l'aire sous une portion de courbe et l'aire totale) sont utilisées pour évaluer les variations de composition des milieux analysés. Il est néanmoins possible d'obtenir des valeurs quantitatives concernant les concentrations en métabolites. En effet, l'aire sous la courbe d'un pic est directement proportionnelle au nombre de noyaux qui lui ont donné naissance. Dès lors, si le pic d'identification d'un composé ne chevauche pas les pics des autres constituants, son aire peut être utilisée pour déterminer directement la concentration de ce constituant, à condition que l'on connaisse l'aire du signal d'un proton dans une molécule donnée. Ce paramètre peut être déterminé à partir d'un étalon interne de concentration connue ou à partir de travaux précédemment effectués.

Représentation des données : analyses statistiques multivariées

Compte tenu du grand nombre de données générées par la spectroscopie, des méthodes statistiques dites « multivariées » doivent être employées. Deux approches principales existent (Lindon *et al.*, 2001) :

- l'approche non supervisée encore appelée analyse de données (« *Data mining* » en anglais) repose sur l'analyse de la variance totale. Il n'y a pas de définition de groupes *a priori*. Ainsi, l'analyse en composante principale (ACP) qui vise à isoler les caractéristiques générales du jeu de données est une méthode non supervisée.

- l'approche supervisée ou reconnaissance de forme (« *Pattern Recognition* » en anglais) utilise la distribution en classes. L'analyse factorielle discriminante (AFD) est une de ces méthodes. L'objectif est d'expliquer les caractéristiques propres à chaque groupe.

Les méthodes statistiques utilisées dans la partie expérimentale sont brièvement exposées ici.

L'analyse en composantes principales

L'analyse en composantes principales est une technique mathématique permettant de décrire les données contenues dans une matrice de données X , regroupant les valeurs prises par les p variables étudiées (ici les données de spectroscopie RMN, en colonnes) pour les q individus (ici des chiens, un chien par ligne).

$$X = \begin{pmatrix} x_1^1 & \dots & \dots & x_1^p \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ \dots & x_i^j & \dots & \dots \\ x_q^1 & \dots & \dots & x_q^p \end{pmatrix}$$

Chaque attribut (noté x^j) est en fait une liste de p valeurs numériques : on le considèrera comme un vecteur d'un espace vectoriel E de dimension p appelé espace de variables. Les coordonnées d'un individu e_i sont :

$$e_i = (x_i^1, x_i^2, \dots, x_i^p).$$

Le but de la méthode est de visualiser le nuage R^p des individus dans un espace de dimension réduite par rapport à la dimension de départ, construit à partir de vecteurs orthogonaux prenant le mieux en compte la variance des données.

La réduction du nombre de variables ne se fait pas par une sélection de certaines d'entre elles. Elle repose sur la construction de nouvelles variables par combinaison linéaire au moyen de

coefficients à partir des variables initiales. Pour cela, on cherche dans \mathbb{R}^p le sous-espace de dimension 1 (donc un axe) qui passe au mieux à travers le nuage des données, c'est-à-dire pour lequel la projection de \mathbb{R}^p soit la moins déformée possible. Cet axe correspond à la première composante principale. On procède de même pour obtenir la deuxième composante principale et une projection dans un plan...

On obtient ainsi une projection du nuage de déformation minimale sur n axes, les distances entre les points projetés étant les plus voisines possibles de celles entre les points initiaux.

Mathématiquement, la solution de ce problème revient à chercher les vecteurs propres de la matrice de covariance X^tX . Ces vecteurs correspondent aux axes principaux.

L'analyse factorielle discriminante

L'analyse factorielle discriminante est une méthode descriptive et explicative s'appliquant à des données quantitatives sur lesquelles une typologie est déjà définie, par exemple un regroupement des chiens selon leur race.

Elle repose sur le calcul de combinaisons linéaires mais orthogonales de variables (axes discriminants ou LD pour *linear discriminant*) permettant une ségrégation des barycentres des groupes (Lindon *et al.*, 2001). Les directions factorielles successives sont déterminées et des graphiques factoriels en deux dimensions permettent de visualiser les individus ou les variables.

L'AFD est réalisée après sélection d'un nombre limité de n variables.

Sélection des variables

Le nombre de variables générées par RMN est généralement nettement supérieur au nombre d'échantillons. Cette redondance d'information empêche l'inversion des matrices de variances-covariances. Une filtration des variables est nécessaire afin de sélectionner un nombre de variables plus restreint et de supprimer les effets de redondance.

L'algorithme de sélection des variables est fondé sur une analyse successive de la variance et des corrélations issues du plan expérimental, en deux étapes (Dumas *et al.*, 2002), avec :

- une analyse de variance (ANOVA) qui révèle les variables significativement affectées par le plan expérimental. Le paramètre de seuil de niveau P_0 correspond à la valeur de la probabilité associée P de l'analyse de variance. Les variables considérées par l'ANOVA comme étant plus significatives que la valeur de seuil P_0 ($P < P_0$) sont sélectionnées pour l'étape suivante.

- un algorithme d'introduction itérative des variables ou « introduction pas-à-pas » est ensuite utilisé. A chaque pas k , est calculé le coefficient de corrélation partielle ρ_k entre chaque variable candidate encore en lice et la variable de classe, codant pour la distribution des individus

en groupes. La variable dont la corrélation est la plus élevée est sélectionnée tandis que les variables linéairement corrélées au sous-espace déjà sélectionné V_k sont rejetées. Le paramètre correspondant à la robustesse du rejet des variables, noté β , varie entre 0 (sélection drastique) et 1 (sélection très tolérante vis-à-vis de la redondance). Cet algorithme se termine lorsque toutes les variables sont sélectionnées ou lorsque les coefficients de corrélation sont tous inférieurs à un seuil final de 10^{-4} (valeur par défaut).

Chaque combinaison de paramètres P et β donne une séquence ordonnée de n_{\max} variables indépendantes. Un dernier paramètre n détermine le nombre ordinal de variables corrélées à la variable de classe qui sont effectivement retenues. De façon empirique, la valeur de n fixée correspond au tiers du nombre d'individus.

Ainsi, chaque jeu de paramètre (P, β, n) fournit une combinaison unique de variables informatives et indépendantes.

Distances entre groupes ou distances de Mahalanobis

Les proximités entre les groupes peuvent être analysées par comparaison des distances entre groupes ou distances de Mahalanobis.

La distance euclidienne entre deux points x et y de coordonnées $x=(x_1, \dots, x_i, \dots, x_n)$ et $y=(y_1, \dots, y_i, \dots, y_n)$ est donnée par la formule :

$$d_E(x, y) = \sqrt{(x_1 - y_1)^2 + \dots + (x_n - y_n)^2} .$$

Cela signifie que toutes les composantes observées sur x ou y contribuent de la même manière au calcul de la distance entre x et y .

En statistiques, pour donner plus de poids aux variables ayant une faible variabilité, on préfère utiliser les distances de Mahalanobis dont le calcul prend en compte la variabilité de chaque variable. La distance de Mahalanobis entre deux points est ainsi définie par :

$$d_M(x, y) = \sqrt{\left(\frac{x_1 - y_1}{s_1}\right)^2 + \dots + \left(\frac{x_n - y_n}{s_n}\right)^2}$$

avec s_i la variance de $(x_i ; y_i)$.

La spectroscopie RMN repose sur les propriétés magnétiques de certains noyaux - notamment le proton (^1H), le carbone 13 (^{13}C) ou le phosphore 31 (^{31}P) - capables d'absorber de l'énergie et d'entrer en résonance lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique.

Très sensible, cette méthode permet d'obtenir sous forme de spectre une « empreinte » de la composition en métabolites d'échantillons biologiques à un instant t .

Des techniques de réduction des données et d'analyses statistiques multivariées sont ensuite nécessaires pour mettre en évidence des perturbations biochimiques.

Cette démarche, qui associe l'obtention de profils biologiques en spectroscopie RMN puis leur exploitation, constitue la technique des signatures biologiques ou métabonomique.

La figure 4 en résume les différentes étapes.

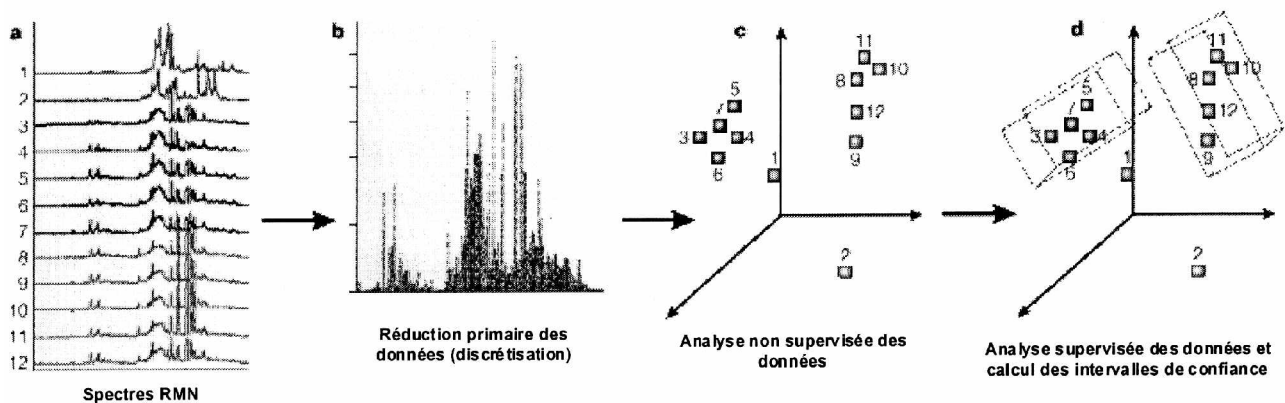


Figure 4 : Techniques et procédures en métabonomique (d'après Nicholson et al., 2002)

a. Acquisition et traitement des spectres RMN

b. La phase de réduction des données permet le passage du spectre à une série de 250 à 1000 intégrales.

c. Des méthodes non supervisées comme l'ACP peuvent être appliquées sans connaissance de classes a priori. Elles permettent de repérer les échantillons en fonction de leur composition biochimique : les échantillons issus d'animaux présentant les mêmes caractéristiques présentent des positions proches dans l'espace canonique.

d. Des méthodes supervisées comme l'AFD peuvent aussi être appliquées. Chaque classe est alors modélisée, les limites de classe et leurs intervalles de confiance sont calculés de manière à construire un modèle prédictif pour des données indépendantes.

Différents types d'échantillons biologiques peuvent être analysés en spectroscopie RMN en vue de l'obtention de signatures biologiques. Un aperçu des applications permises par cette technique novatrice est présenté dans le paragraphe suivant.

Supports biologiques et techniques

Spectroscopie RMN de liquides biologiques

Les signatures biologiques sont le plus souvent obtenues à partir de liquides biologiques dont l'obtention est non invasive, comme l'urine ou le sang. Lorsqu'ils sont disponibles, d'autres liquides biologiques, tels que le liquide cébrospinal, la bile ou le liquide séminal, peuvent également être utilisés.

Ces liquides biologiques contiennent des milliers de métabolites différents et leur composition varie au cours du temps en fonction de leur rôle biologique, de l'intégrité fonctionnelle des organes en relation et des ajustements constants du milieu extracellulaire. Ainsi, l'observation des profils obtenus par RMN peut refléter à la fois les variations physiologiques et l'impact pathologique d'un toxique ou d'une maladie sur un ou plusieurs organes. Les méthodes d'exploitation des données présentées précédemment permettent de classer les échantillons et de révéler les zones de perturbations spectrales significatives.

L'identification des molécules n'est pas nécessaire pour classer les échantillons. Cependant, il peut être intéressant d'identifier les métabolites différenciant les spectres pour explorer les biomécanismes mis en jeu. De plus, l'allure des spectres d'urine et de plasma en spectroscopie RMN du proton commence à être connue, de nombreuses études métabonomiques ayant déjà fait l'objet de publications, et il est possible d'attribuer des composés à de nombreuses zones de résonance, sur la base du déplacement chimique et de la multiplicité du signal. Toutefois, l'usage de RMN en deux dimensions est parfois utile pour augmenter la dispersion des signaux, mettre en évidence la corrélation entre les signaux et faciliter ainsi l'identification des composés impliqués (Tang *et al.*, 2004). Le couplage de la RMN du proton avec celle d'autres noyaux peut également aider à l'identification des pics (corrélations hétéronucléaires $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$, $^1\text{H} - ^{31}\text{P}$). Ensuite, si les techniques citées ci-dessus se révèlent insuffisantes, des techniques chromatographiques telles que l'HPLC peuvent être utilisées pour séparer les constituants du mélange avant l'analyse en RMN. Certaines études associent directement HPLC et RMN voire HPLC, RMN et MS pour déterminer la structure de métabolites endogènes (Gavaghan *et al.*, 2001 ; Williams *et al.*, 2005).

Spectroscopie RMN de tissus *in vitro*

Si des tissus sont disponibles, des informations complémentaires par rapport à celles portées par les liquides biologiques peuvent être obtenues. Bien que la RMN *in vitro* ait été utilisée pour l'étude biochimique de tissus anormaux, la qualité des spectres est toujours compromise car les bas champs magnétiques utilisés conduisent à une mauvaise sensibilité et une dispersion des pics. De plus, l'hétérogénéité des échantillons crée une « inhomogénéité » du champ magnétique qui diminue encore la sensibilité. Par conséquent, ces techniques sont peu utilisées sur les tissus entiers. Le plus souvent, elles sont mises en œuvre après différentes extractions, bien que ces procédés puissent engendrer une perte de composés.

Ces dernières années, le développement d'une technique de RMN où l'échantillon est soumis à une " rotation à l'angle magique " (Magic Angle Spinning - NMR ou MAS - NMR) a amélioré l'étude directe des tissus en apportant une amélioration de la résolution des pics et de la détection des métabolites. En faisant tourner rapidement l'échantillon sur lui-même (4 - 6 MHz) à un angle de $54,7^\circ$ par rapport au champ magnétique appliqué, on réduit l'élargissement des pics liés à « l'inhomogénéité » du champ magnétique causé par l'hétérogénéité de l'échantillon et par les couplages dipolaires. Ainsi, il est possible d'obtenir des spectres de tissus entiers de très bonne résolution sans traitement préalable des échantillons et en utilisant seulement 20 mg de tissus. Cette technique devrait permettre de franchir le fossé entre l'analyse des liquides biologiques et l'histopathologie et ainsi améliorer la compréhension des mécanismes de toxicité (Lindon *et al.*, 2004).

Spectroscopie RMN de tissus *in vivo*

A l'origine appliquée *in vitro*, la spectroscopie RMN est utilisée depuis une vingtaine d'années pour l'étude des tissus biologiques *in vivo*. La spectroscopie RMN doit son développement à l'essor de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) couramment utilisée en clinique, les deux techniques étant mises en œuvre au moyen du même appareil. Néanmoins, malgré de récents progrès, la plupart des mesures accessibles par spectroscopie RMN *in vivo* nécessitent des étapes de mise au point difficilement envisageables en routine et cette technique reste à l'heure actuelle un outil de recherche biomédicale.

IRM et RMN *in vivo* ne doivent pas être confondues, leur mise en œuvre et leur finalité étant complètement différentes. L'IRM utilise les propriétés magnétiques des noyaux d'hydrogène pour évaluer leur densité et obtenir des images en coupes des organismes vivants, tandis que la spectroscopie RMN de tissus *in vivo*, qui permet l'acquisition de spectres similaires à ceux obtenus avec des liquides biologiques, est un moyen d'étude des processus métaboliques.

Domaines d'application

Toxicologie et pharmacologie

La métabonomique par spectroscopie RMN a trouvé de nombreuses applications en toxicologie (Lindon *et al.*, 2004).

Cette méthode se révèle particulièrement intéressante pour les essais pré-cliniques en pharmacologie. En effet, l'industrie pharmaceutique a besoin de techniques permettant une détection précoce et fiable de la toxicité des molécules afin d'éviter d'investir dans le développement de produits qui ne pourront pas entrer sur le marché. Les signatures biologiques, qui permettent de déceler des variations subtiles du métabolisme, répondent à cette attente.

Détermination des variations physiologiques

Avant d'évaluer les effets d'une substance toxique, il est nécessaire de savoir reconnaître les perturbations des profils attribuables à des variations physiologiques. En effet, nombreux facteurs physiologiques et environnementaux peuvent avoir une influence sur la composition des échantillons biologiques. Ces variations incluent, par exemple, l'apparition de métabolites - auparavant absents - à la suite de l'ingestion d'un aliment mais aussi des variations plus subtiles des concentrations relatives en différents composants.

Chez les espèces de laboratoire, les signatures biologiques ont permis de différencier des échantillons d'urine selon l'espèce, la souche, le sexe, le stade du cycle œstral, le régime alimentaire ou la microflore intestinale (Bollard *et al.*, 2005)...

Application aux études toxicologiques pré-cliniques

La spectroscopie RMN du proton a été utilisée pour étudier la composition des liquides biologiques avant et après l'administration d'un grand nombre de substances toxiques.

Des modèles statistiques ont été construits afin d'aider l'étude toxicologique à trois niveaux (Nicholson *et al.*, 1999, Lindon *et al.*, 2004): (i) déterminer si l'échantillon est normal (par exemple, est-ce qu'il appartient à une population témoin ?), (ii) classer les échantillons anormaux selon les organes cibles ou les sites d'action et, (iii) déterminer les régions du spectre responsables de déviations par rapport aux profils normaux afin de mettre en évidence des marqueurs de toxicité qui permettront de comprendre les mécanismes impliqués.

Jusqu'à présent, la métabonomique a surtout été utilisée pour étudier la toxicité sur le foie et le rein, mais certaines études ont également concerné les atteintes au niveau testiculaire, cardiaque ou neurologique (Lindon *et al.*, 2004).

L'administration d'une substance toxique induit généralement une série de changements métaboliques et les métabolites concernés ne retournent pas forcément à leurs conditions homéostatiques initiales. Quand les liquides biologiques sont prélevés à différents intervalles de temps, une trajectoire biochimique de la réponse peut-être identifiée.

Il est possible de combiner les données RMN de différents liquides biologiques, extraits tissulaires ou tissus entiers pour évaluer un effet toxique.

La formation du consortium COMET (Consortium on Metabonomic Toxicology) par six compagnies pharmaceutiques (Bristol-Meyers-Squibb, Eli Lilly, Hoffman-La Roche, NovoNordisk, Pfizer et Pharmacia, les deux derniers ayant maintenant fusionné) et l'Impérial College de Londres illustre l'intérêt de l'usage de la métabonomique pour l'évaluation de la sécurité des médicaments. Le groupe a été formé pour recueillir des données métabonomiques générées par l'analyse, en spectroscopie RMN du proton, d'échantillons d'urine, de sérum ou de tissus en vue de l'application au screening toxicologique de médicaments potentiels (Lindon *et al.*, 2003).

En deux ans, le COMET a construit une banque de données pour une large gamme de composés modèles, médicaments et substances toxiques. Le consortium a concentré ses efforts sur l'hépatotoxicité et la néphrotoxicité des composés chez le rat et la souris et l'intervalisation des jeux de données produits par les différents groupes.

Ainsi, pendant la phase initiale du projet, une comparaison détaillée a été faite sur la capacité des six compagnies à produire des échantillons d'urine et de sérum avec une bonne reproductibilité, lors d'une étude sur la toxicité de l'hydrazine chez des rats mâles. Un niveau exceptionnel de reproductibilité des spectres et de la composition biochimique des échantillons a été mis en évidence entre les échantillons des six compagnies, attestant de la reproductibilité des résultats obtenus en spectroscopie RMN et de leur possible transposition d'un laboratoire à l'autre (Keun *et al.*, 2002).

Recherche biomédicale et diagnostic clinique

La spectroscopie RMN est un outil performant pour l'investigation de nombreuses maladies comme les maladies métaboliques héréditaires, les insuffisances organiques, les cancers... (Lindon *et al.*, 2003).

Par exemple, la spectroscopie RMN a été utilisée pour étudier les perturbations des profils métaboliques d'échantillons urinaires de patients atteints de maladies métaboliques congénitales, telles que l'acidurie 2-hydroxyglutarique ou la maladie des urines à odeur de sirop d'érable (Holmes *et al.*, 1997). Ont ainsi été mis en évidence des métabolites anormalement présents dans les urines

des malades et dont l'existence n'avait pas été détectée par les techniques traditionnelles ou génétiques.

Plus récemment, les patients atteints d'occlusion des artères coronaires ont été identifiés sur la base de spectres en RMN du proton d'échantillons de sérum (Brindle *et al.*, 2002). L'analyse des spectres a permis de détecter l'existence d'une atteinte coronaire mais également de la grader : les représentations graphiques par PLS-DA (Partial Least Squares - Discriminant Analysis) montrent une séparation des individus selon le nombre d'artères coronaires sténosées (de une à trois).

Différentes études ont utilisé des spectres d'extraits tissulaires ou de tissus entiers pour identifier les métabolites présents dans certaines tumeurs, séparer les tumeurs selon leur type et les classer. Les tumeurs pituitaires, les fibrosarcomes ou les tumeurs hépatiques ont ainsi été explorés (Howells *et al.*, 1992 et 1993).

La spectroscopie RMN *in vivo*, encore peu utilisée, trouve ses principales applications dans la recherche biomédicale. Le noyau de phosphore ^{31}P fut le premier à être utilisé en spectroscopie *in vivo*, en particulier pour l'étude des muscles et des myopathies (Morvan *et al.*, 1990). La spectroscopie du ^{31}P permet de suivre de manière très précise et atraumatique le métabolisme énergétique cellulaire par la détection de métabolites à haute énergie tels que l'ATP et la phosphocréatine.

La deuxième application principale de la spectroscopie RMN *in vivo* concerne l'exploration du cerveau par détection des noyaux d'hydrogène ^1H et de carbone ^{13}C . La RMN permet la quantification de certains marqueurs neuronaux (N-acétyl-aspartate), astrocytaires (inositol, glutamine) ou de neurotransmetteurs (GABA, aspartate). Elle permet également de mesurer la vitesse de certaines réactions chimiques *in vivo* par marquage au ^{13}C des flux métaboliques (Lebon *et al.*, 2002). Ces approches sont utilisées pour l'étude de pathologies neurodégénératives (Henry *et al.*, 2002).

La spectroscopie RMN permet l'analyse de nombreux types d'échantillons biologiques.

Les liquides biologiques, en particulier les urines et le plasma, demeurent les plus utilisés. Néanmoins, les tissus entiers peuvent également être exploités, d'autant que les progrès techniques ont permis d'améliorer la qualité de ces spectres.

De nombreux domaines d'application sont concernés par la métabonomique. Ainsi, la mise en évidence précoce d'effets toxiques est intéressante en recherche pharmacologique. En médecine, la métabonomique permet une meilleure compréhension des processus pathologiques.

Notre étude a consisté à appliquer la méthode des signatures biologiques pour analyser les variations physiologiques du métabolisme chez le chien.

Partie 2 : Partie expérimentale

Objectifs

L'étude des profils métaboliques, principalement des liquides biologiques, permet de fournir des informations sur la toxicité de médicaments, les processus pathologiques et les fonctions géniques. Néanmoins, pour pouvoir se fier aux perturbations des profils métaboliques observées dans ce type d'études, il est nécessaire de caractériser les bornes de la normalité « métabonomique ».

En effet, de nombreux facteurs intrinsèques (espèce, souche, âge, sexe...) ou extrinsèques (alimentation, température, stress...) affectent la composition en métabolites des liquides biologiques, même si les variations relatives sont généralement inférieures à celles causées par l'exposition à un toxique ou un agent pathogène.

La plupart des études visant à caractériser les variations engendrées par différents facteurs intrinsèques ou extrinsèques concernent les espèces de laboratoire, élevées dans des conditions environnementales parfaitement maîtrisées et dont l'origine génétique est identique.

Chez l'homme, l'influence de facteurs environnementaux liés au mode de vie rend plus difficile l'interprétation des variations observées (Lenz *et al.*, 2004).

Aucune étude n'a été publiée sur l'espèce canine, espèce vivant au contact de l'homme et pour laquelle on rencontre également une diversité de mode de vie et une diversité raciale entretenue par sélection.

L'objectif de notre étude était d'étudier l'effet des paramètres « âge » et « état corporel » sur le métabolisme général à partir de l'analyse par spectrométrie RMN d'urines de chiens d'état corporel variable.

De plus, en relevant le maximum de renseignements sur les animaux et leur environnement, nous avons cherché à voir si, à travers cette étude pilote, il était possible d'identifier les sources de variations prépondérantes du métabolisme, chez le chien.

Matériel et méthodes

Sujets

Critères d'inclusion et d'exclusion

L'objet de cette étude concernant l'étude des variations physiologiques, n'ont été retenus que des animaux reconnus comme :

- sains sur le plan clinique et n'ayant pas présenté de troubles pathologiques aigus dans les quinze jours ayant précédé la date du prélèvement,
- exempts d'affections intercurrentes diagnostiquées, notamment de dysendocrinies (diabète sucré, syndrome de Cushing, hypothyroïdisme...) ou d'insuffisances fonctionnelles (insuffisance rénale, hépatique, cardiaque, pancréatique...),
- ne recevant aucun traitement pouvant entraîner des perturbations métaboliques (antibiotiques, anti-inflammatoires, diurétiques...) et n'en ayant pas reçu depuis plus d'une semaine. Pour les formulations retard (notamment de corticoïdes), ce délai a été porté à 4 semaines. Par contre, l'application de produits à usage externe (anti-parasitaires, shampoings...) a été tolérée.

Les collectes ont été réalisées à l'occasion de consultations vaccinales aux cliniques de l'Ecole vétérinaire de Toulouse, lors de regroupement de chiens en clubs d'éducation, ou lors de visite chez les propriétaires. S'agissant d'une première étude dans le domaine, aucune restriction n'a été apportée concernant la race, l'âge ou le mode de vie des animaux. Cependant, seuls des sujets mâles entiers ont été retenus car les prélèvements d'urines par miction spontanée pouvaient être facilement réalisés sur le terrain.

Identification des animaux, recueil des informations

Les animaux étaient identifiés par le relevé de leur nom et des coordonnées de leur propriétaire.

Pour chaque chien, différents paramètres ont également été relevés :

- sa race ou le croisement dont il était issu pour les animaux de race croisée,
- son format : petit (poids inférieur à 10 kg), moyen (poids compris entre 10 et 25 kg), grand (poids compris entre 25 et 45 kg) ou géant (poids supérieur à 45 kg),

- son âge,
- son état corporel, apprécié par l'utilisation du système « Body Condition Score » (BCS) mis au point par le centre de recherche en alimentation animale de Nestlé PURINA. Cette échelle comporte 9 niveaux, le premier correspondant à un état cachectique, le dernier à un stade d'obésité avancé (voir annexe 1). Elle constitue un moyen simple à mettre en œuvre pour évaluer l'état corporel du chien avec une répétabilité et une reproductibilité démontrées : une corrélation entre le BCS et le pourcentage de graisse corporelle déterminée par DEXA (*Dual energy X-ray absorptiometry*, absorptiométrie double énergie à rayons X) ou entre le BCS et le poids corporel relatif (poids réel/ poids idéal) a été mis en évidence (Laflamme *et al.*, 1997 ; Laflamme *et al.*, 1994).
- son poids réel, ainsi qu'une estimation de son poids idéal le cas échéant,
- son type d'alimentation. La marque et la gamme des aliments industriels ont été relevées lorsque le même aliment était toujours distribué.
- le délai depuis son dernier repas,
- son mode de vie (ou son type d'activité) : vie en appartement, vie en maison avec jardin, travail ou pratique sportive intensive (agility, ring, troupeaux...), chasse,
- l'heure du prélèvement urinaire et de la congélation.

Réalisation des prélèvements

Les prélèvements urinaires ont été réalisés par miction spontanée car cette technique, facile à mettre en œuvre sur un chien mâle, ne présente aucune contre-indication. Pour cela, des poches à prélèvements à usage unique, de type poches à colostomie ont été utilisées (« Poches Combihésives 2S », Convatec Limitec, Deeside, GB). La poche à prélèvement était placée sur le pénis du chien et maintenue par deux liens en tissu noués sur le dos de l'animal. Le chien était promené en laisse. Après émission d'urine, le dispositif était retiré.

Ensuite, les urines ont été aliquotées par prélèvement au milieu de la poche. Pour chaque chien, deux tubes contenant 1 mL d'urine chacun ont été conservés par congélation à -20°C dans l'heure suivant la récolte.

Préparation des échantillons et spectroscopie RMN

Après décongélation et homogénéisation, 500 μL d'urines ont été prélevées et mélangées avec 200 μL d'une solution tampon phosphate de $\text{pH} = 7,37$, contenant du propionate de triméthylsilyl (TMSP) utilisé comme référence interne. La solution tampon de TMSP a été préparée par dissolution de 0,27 g de dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4), de 0,78 g d'hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4) et de 0,080 g de TMSP dans 100 mL d'eau deutérée (D_2O).

Les tubes contenant le mélange ont été centrifugés pendant 10 minutes à 8000 tours/min puis 600 μL de surnageant ont été placés dans des tubes pour spectromètre RMN de 5 mm de diamètre.

Les spectres ont été obtenus à une température de 300 K.

Les analyses ont été réalisées avec un spectromètre Bruker Avance DRX 600 (Bruker, Karlsruhe, Allemagne) opérant à une fréquence de résonance du proton de 600,13 MHz et équipé d'une sonde cryogénique triple noyau $^1\text{H} - ^{13}\text{C} - ^{15}\text{N}$.

Les spectres ont été obtenus en utilisant la séquence « Improved Watergate » (Water Gradient Tailored Excitation) permettant de supprimer le signal de l'eau. Le signal a été acquis en accumulant 128 FIDs (signaux de précession libre) sur 32 K points mémoire pour une fenêtre spectrale de 12 ppm. Une fonction exponentielle équivalente à un nivellement de 0,3 Hz de la ligne de base a été appliquée avant la transformée de Fourier. Le zéro a été attribué au pic du TMSP.

Des intégrations relatives ont été réalisées avec le logiciel Amix (Analysis of MIXtures, version 31, Bruker, Analytische Messtechnik, Rheinstetter, Allemagne) sur des intervalles de 0,04 ppm. La région de déplacement chimique 4,5 à 6,5 ppm a été ramenée à zéro pour supprimer l'effet de résonance de l'eau et les effets de relaxation croisée du signal de l'urée avec des protons du solvant.

La matrice obtenue pour les analyses statistiques comportait 189 colonnes correspondant aux 189 intégrations relatives réalisées sur les 189 portions de 0,04 ppm, et chaque colonne a été utilisée comme variable.

Analyses statistiques

Tests du Chi 2

Des tests du Chi 2 ont été réalisés sous Splus 2000® (Math Soft Inc, Seattle WA, USA) pour tester l'indépendance entre les paramètres relevés sur les animaux (âge, état corporel, race, alimentation et activité).

Le test du Chi 2 peut en effet être utilisé pour tester l'indépendance de deux caractères statistiques mesurés sur une même population. On parle alors de test du « Chi 2 de contingence ».

Ainsi, si l'on considère deux variables aléatoires qualitatives X et Y, observées sur un échantillon de taille n, le test du Chi 2 ne permettra pas de répondre exactement à la question « les deux variables aléatoires sont-elles indépendantes ? » mais il permettra de prendre une décision : soit on peut accepter que X et Y sont indépendantes avec un risque α de se tromper, soit on ne peut accepter qu'elles soient indépendantes, cela avec un risque α de se tromper. α , dit risque de première espèce, est en pratique fixé à 5%.

Nous nous proposons d'expliquer ici le principe du test du Chi 2 à partir des deux variables aléatoires X et Y. Les modalités de classe de X seront notées $x_1 \dots x_i \dots x_r$ ($1 \leq i \leq r$) et celles de Y $y_1 \dots y_j \dots y_s$ ($1 \leq j \leq s$). La table de contingence donne le nombre d'occurrence des valeurs conjointes de X et de Y :

X \ Y	y_1	...	y_j	...	y_s	total
x_1	n_{11}	...	n_{1j}	...	n_{1s}	$n_{1\cdot}$
...
x_i	n_{i1}	...	n_{ij}	...	n_{is}	$n_{i\cdot}$
...
x_r	n_{r1}	...	n_{rj}	...	n_{rs}	$n_{r\cdot}$
total	$n_{\cdot 1}$...	$n_{\cdot j}$...	$n_{\cdot s}$	n

avec n_{ij} l'effectif conjoint de x_i et de y_j (nombre d'individus pour lesquels X prend la valeur x_i et Y la valeur y_j), $n_{i\cdot}$ l'effectif marginal de x_i (nombre d'individus pour lesquels X prend la valeur x_i) et $n_{\cdot j}$ l'effectif marginal de y_j (nombre d'individus pour lesquels Y prend la valeur y_j).

A partir des effectifs contenus dans le tableau de contingence, les fréquences conditionnelles peuvent être calculées. Pour $x = 1 \dots i \dots r$ et $y = 1 \dots j \dots s$, elles sont notées :

$$f_{i/j} = \frac{n_{ij}}{n_{\cdot j}} \text{ et } f_{j/i} = \frac{n_{ij}}{n_{i\cdot}} .$$

Les distributions conditionnelles constituent les « profils-lignes » et les « profils-colonnes ».

Les hypothèses sont posées dans cet ordre :

$$\left| \begin{array}{l} H_0 : X \text{ et } Y \text{ sont indépendantes} \\ H_1 : X \text{ et } Y \text{ sont dépendantes.} \end{array} \right.$$

Si X et Y sont indépendantes, les « profils-lignes » seront tous peu différents de la distribution empirique de Y, et les « profils-colonnes » de celle de X :

$$f_{i/j} = \frac{n_{ij}}{n_{\bullet j}} \approx f_{i\bullet} = \frac{n_{i\bullet}}{n} \text{ et } f_{j/i} = \frac{n_{ij}}{n_{i\bullet}} \approx f_{\bullet j} = \frac{n_{\bullet j}}{n}.$$

Ceci est équivalent à dire que les fréquences conjointes doivent être proches des produits de fréquences marginales :

$$f_{ij} = \frac{n_{ij}}{n} \approx f_{i\bullet} \cdot f_{\bullet j} = \frac{n_{i\bullet}}{n} \cdot \frac{n_{\bullet j}}{n}.$$

La distance du Chi 2 entre les fréquences conjointes (distribution observée) et les produits de fréquences marginales d'autre part (distribution théorique) est donnée par la relation :

$$D_{\chi^2} = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^s \frac{(f_{ij} - f_{i\bullet} \cdot f_{\bullet j})^2}{f_{i\bullet} \cdot f_{\bullet j}} = -1 + \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^s \frac{n_{ij}^2}{n_{i\bullet} \cdot n_{\bullet j}}.$$

Pour n assez grand (en pratique $n > 5$), la loi de $n \cdot D_{\chi^2}$ peut être approchée par une loi du Chi 2, dont le degré de liberté ν est égal au nombre de classes moins 1, diminué du nombre de paramètres estimés à partir des données groupées en classes. Ici, les fréquences marginales ont été estimées : il y en a (r-1) pour le caractère X, et (s-1) pour le caractère Y, la dernière étant le complément à 1 de la somme des autres. Le degré de liberté ν de la loi du Chi 2 est donc égal à :

$$\nu = rs - 1 - (r - 1) - (s - 1) = (r - 1)(s - 1).$$

L'hypothèse H_0 est acceptée lorsque valeur de $n \cdot D_{\chi^2}$ calculée est comprise dans l'intervalle $[0; \chi_{\nu, 1-\alpha}^2]$. En effet, la probabilité pour qu'une variable suivant la loi du Chi 2 de degré de liberté ν (χ_{ν}^2) prenne une valeur dans cet intervalle est égale à $1-\alpha$ (soit 95% en pratique). Ainsi, si la valeur de $n \cdot D_{\chi^2}$ calculée est supérieure à $\chi_{\nu, 1-\alpha}^2$, on considère que $n \cdot D_{\chi^2}$ ne suit pas la loi du Chi 2 et l'hypothèse d'indépendance entre X et Y est rejetée avec un risque α de se tromper.

Analyses statistiques multivariées

Après obtention des données de la RMN, des analyses statistiques multidimensionnelles (ACP et AFD) ont été effectuées avec les logiciels SAS® (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) et Splus 2000® avec les bibliothèques de fonction *Mass* et *Multidim*.

Une analyse en composante principale a d'abord été réalisée sous Splus 2000® pour observer la dispersion des individus et voir si certaines tendances au regroupement apparaissaient parmi les échantillons. Ensuite, des analyses factorielles ont été effectuées, toujours avec Splus 2000®, sur la base de classes établies selon l'âge, le BCS, la race, l'alimentation et le mode de vie.

Dans un deuxième temps, les variables sélectionnées au terme de l'analyse pas-à-pas ont été exportées sous SAS® pour calculer les corrélations canoniques et les distances de Mahalanobis entre les groupes. Les corrélations canoniques correspondent aux coefficients de corrélation par projection orthogonale des variables sélectionnées selon chacune des directions factorielles discriminantes.

Résultats

Caractérisation de l'échantillon

Les urines de 95 chiens mâles non castrés, cliniquement sains, sans antécédents médicaux et sans traitement en cours ont été collectées entre le 30/10/04 et le 05/02/05.

Répartition en fonction de l'âge

Les âges des chiens s'échelonnent de 0,2 (2,5 mois) à 13,75 ans (13 ans et 8 mois) avec une répartition régulière des points entre ces deux extrêmes (Figure 5).

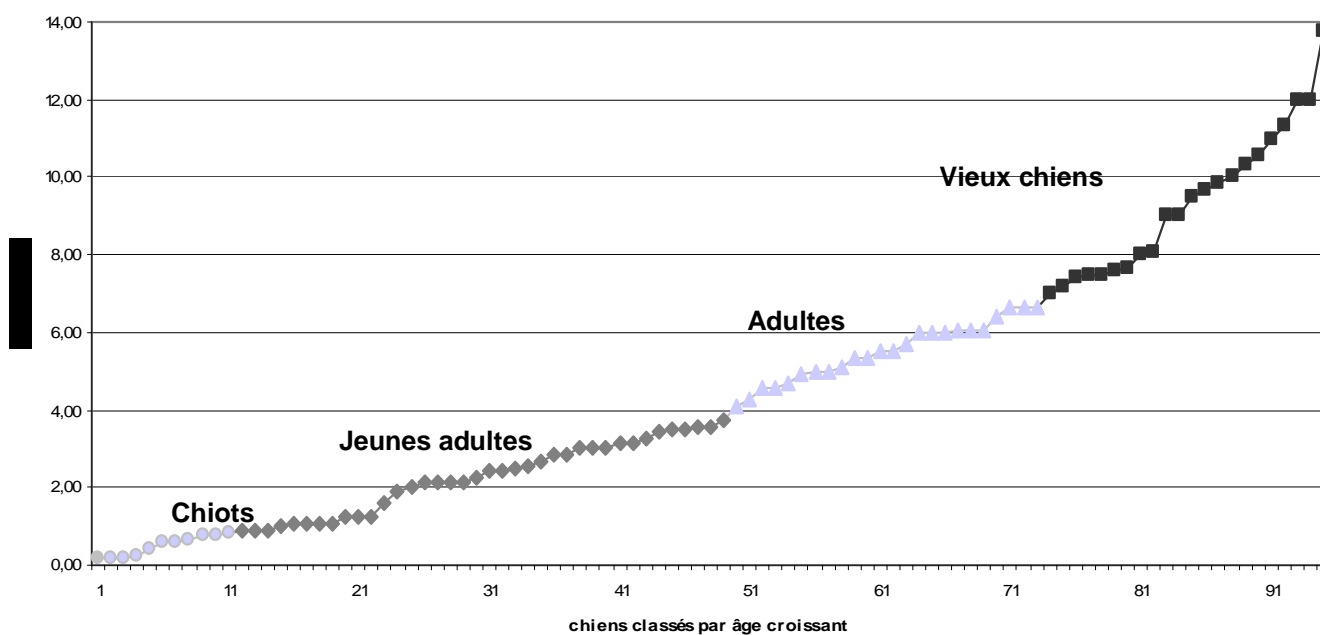


Figure 5 : Représentation de l'âge des chiens utilisés dans l'expérience

Pour la suite de ce travail, les chiens ont été regroupés en quatre classes d'âges, avec : les chiots de moins de 10 mois (impubères), les jeunes adultes de 10 mois à 4 ans, les adultes de 4 à 7 ans et les adultes de plus de 7 ans.

Nous reviendrons sur cette division en quatre classes au moment des analyses des données obtenues par RMN sur les urines (voir *Résultats, Evolution avec l'âge des profils métaboliques*).

Races représentées

Aucune sélection concernant la race n'a été réalisée. Aussi, 34 races sont-elles représentées.

Certaines, proches sur le plan morphologique et génétique, ont été regroupées :

- les colleys et les border collies,
- les golden retrievers et les Labrador retrievers,
- les cockers anglais et américains,
- les chiens courants (c'est-à-dire les grands et petits bleus de Gascogne, les gascons Saint-Ongeois, les ariégeois, les griffons nivernais, les porcelaines, les brunos du Jura, les courants français blancs et noirs et les chiens issus de croisements entre ces races).

Quatre chiens de races croisés n'ont pas pu être rattachés à une autre race : il s'agit d'un chien croisé Labrador retriever et beauceron, d'un croisé spitz et épagneul papillon, d'un croisé Labrador retriever et d'un croisé fox terrier.

Au final, l'échantillon se compose de 21 groupes raciaux différents auxquels s'ajoutent les quatre chiens de races croisées (Tableau 2).

Races	classes d'âge				Total
	1	2	3	4	
Bergers allemands	1		1	3	5
Bergers belges		5	4	1	10
Beaucerons	3	1		2	6
Border collies et colleys		3	4	4	11
Labrits				1	1
Rottweilers	3	1		1	5
Dobermanns		1			1
Schnauzers			1		1
Hovawarts		1			1
Sharpeis		1			1
Bouledogues français	1				1
Dogues du Tibet		1			1
Dogues allemands		1			1
Chiens courants	1	6	10	7	24
Boxers	1	1			2
Westies		1			1
Jack Russel terriers		1			1
Retrievers	1	7	2	1	11
Cockers		4		1	5
Caniches		1			1
Epagneuls papillons			1		1
Croisés	0	2	1	1	4
Total	11	38	24	22	95

Tableau 2 : Effectifs des différentes races et répartition par classe d'âge.

Classes d'âge de 1 à 4 avec : **1**, chiots de moins de 10 mois ; **2**, jeunes adultes de 10 mois à 4 ans ; **3**, adultes de 4 à 7 ans ; **4**, adultes de plus de 7 ans.

Etat corporel

Tous les niveaux de l'échelle du « Body Condition Score system », de la note 1 à la note 9, ont été attribués.

Relation état corporel/ poids corporel relatif

Malgré des disparités morphologiques importantes, liées en particulier au grand nombre de races représentées, l'estimation du BCS et du poids corporel idéal sont cohérentes et le poids corporel relatif (poids corporel mesuré/poids corporel idéal) est colinéaire au BCS attribué (Figure 6).

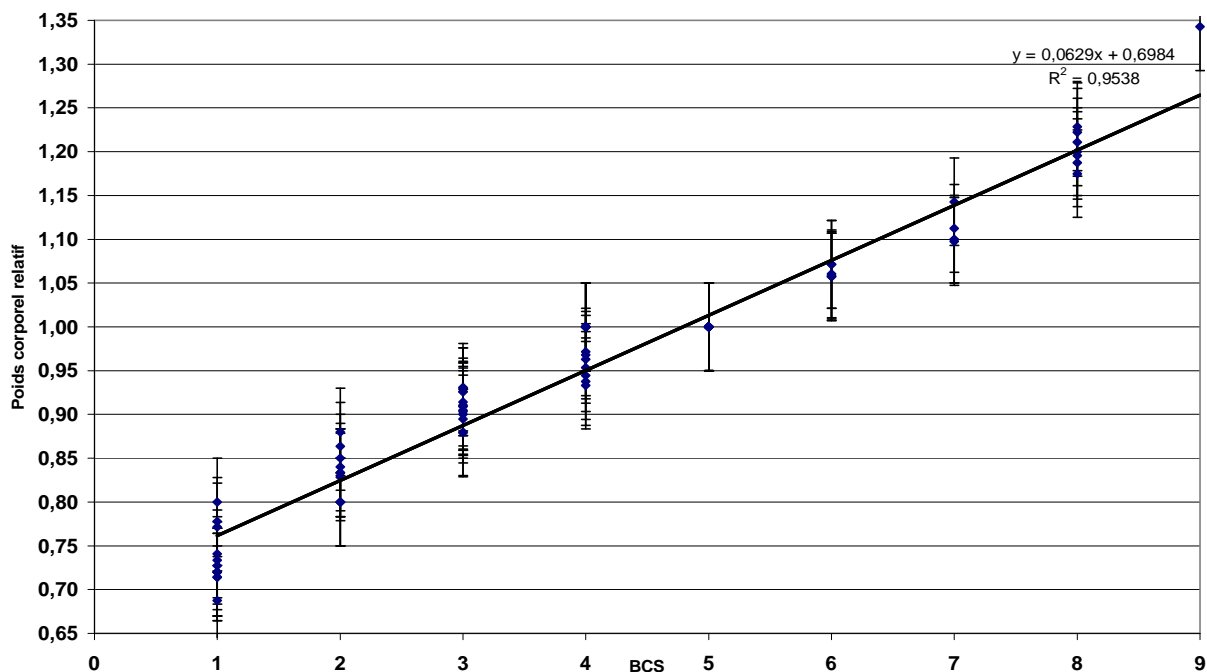


Figure 6 : Poids corporel relatif en fonction du BCS attribué.

Poids corporel relatif = Poids réel/ Poids idéal estimé

Aussi, seule l'estimation par le BCS a été utilisée pour décrire l'état corporel par la suite.

Effectif des différentes catégories d'états corporels

Les effectifs dans chaque catégorie d'état corporel ne sont pas homogènes : les chiens d'état corporel supérieur à 5 sont sous représentés (Figure 6).

38% des chiens prélevés sont maigres (notes 1, 2 et 3) avec un tiers d'entre eux dans un état cachectique (note 1).

42% ont un état d'entretien idéal (notes 4 et 5).

11,6% présentent un surpoids (notes 6 et 7) et 8,4% des chiens sont obèses (notes 8 et 9).

Répartition des différents niveaux d'états corporels en fonction de l'âge et de la race

Répartition en fonction de l'âge

Chez les chiots, on ne trouve que des animaux avec un état d'entretien correct (notes 4 et 5) voire légèrement maigres (un chiot Rottweiler de 8 mois avec une note 3) (Figure 7).

L'existence d'une relation entre âge et BCS est explorée par un test du Chi 2 qui montre l'absence de corrélation significative entre l'âge et l'état corporel (avec un risque 5%, $\chi^2 = 18,41$; $df = 21$; $p = 0,6232$).

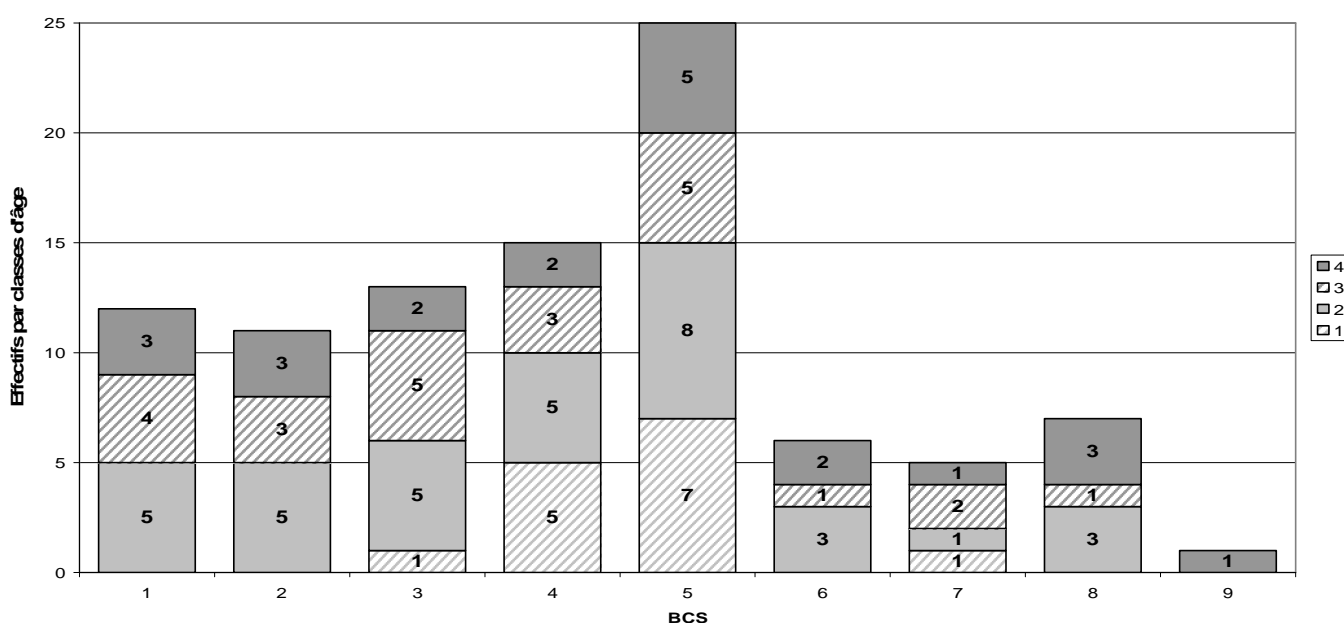


Figure 7 : Répartition des âges des chiens au sein des niveaux d'état corporels.

BCS de 1 à 9. **Classes d'âge** de 1 à 4 avec : **1**, chiots de moins de 10 mois ; **2**, jeunes adultes de 10 mois à 4 ans ; **3**, adultes de 4 à 7 ans ; **4**, adultes de plus de 7 ans.

Répartition des états corporels en fonction de la race

La répartition des états corporels est corrélée à celle de la race (Test du Chi 2 : $\chi^2 = 79,33$; $df = 56$; $p = 0,0218$) (Figure 8).

Deux groupes raciaux s'opposent par leur BCS : le groupe des chiens courants qui sont majoritairement maigres (moyenne des BCS 2,71) et le groupe des retrievers qui présentent en moyenne un léger surpoids (moyenne des BCS 6,06) (Tableau 3).

Pour les autres races, les états corporels moyens sont compris entre 4 et 5 (état d'entretien optimal).

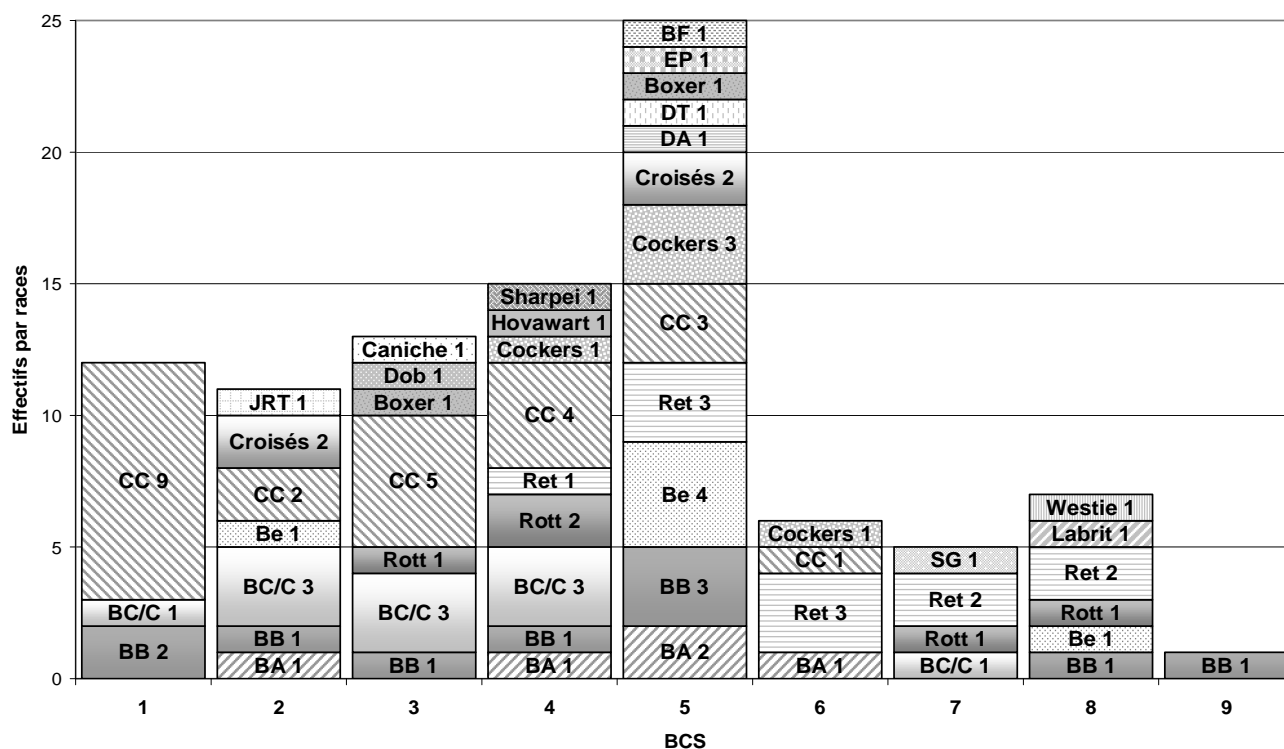


Figure 8 : Représentativité des races au sein des niveaux d'état corporel.

BCS : 1 à 9. **Races** : **BA**, bergers allemands ; **BB**, bergers belges ; **BC/C**, border collies et colleys ; **Be**, beaucerons ; **BF**, bouledogues français ; **CC**, chiens courants ; **DA**, dogues allemands ; **Dob**, dobermanns ; **DT**, dogues du Tibet ; **EP**, épagneuls papillons ; **JRT**, Jack Russel terriers ; **Ret**, retrievers ; **Rott**, rottweilers ; **SG**, schnauzers géants.

Races	BCS	Effectifs
Beaucerons	2	1
	5	4
	8	1
	Moyenne BCS	5,00
Médiane	5,00	
Ecart-type	1,90	
Bergers allemands	2	1
	4	1
	5	2
	6	1
	Moyenne BCS	4,40
Médiane	5,00	
Ecart-type	1,52	
Bergers belges	1	2
	2	1
	3	1
	4	1
	5	3
	8	1
	9	1
	Moyenne BCS	4,30
Médiane	4,50	
Ecart-type	2,71	
Border collies et colleys	1	1
	2	3
	3	3
	4	3
	7	1
Moyenne BCS	3,18	
Médiane	3,00	
Ecart-type	1,60	
Boxers	3	1
	5	1
Moyenne BCS	4,00	
Médiane	4,00	
Ecart-type	1,41	
Chiens courants	1	9
	2	2
	3	5
	4	4
	5	3
	6	1
Moyenne BCS	2,71	
Médiane	3,00	
Ecart-type	1,63	

Cockers	4	1
	5	3
	6	1
Moyenne BCS	5,00	
Médiane	5,00	
Ecart-type	0,71	
Retrievers	4	1
	5	3
	6	3
	7	2
	8	2
Moyenne BCS	6,09	
Médiane	6,00	
Ecart-type	1,30	
Rottweilers	3	1
	4	2
	7	1
	8	1
Moyenne BCS	5,20	
Médiane	4,00	
Ecart-type	2,17	
Croisés	2	2
	5	2
Bouledogues français	5	1
Caniches	3	1
Dobermanns	3	1
Dogues Allemand	5	1
Dogues du Tibet	5	1
Epagneuls papillons	5	1
Hovawarts	4	1
Jack Russel terriers	2	1
Labrits	8	1
Schnauzers géants	7	1
Sharpeis	4	1
Westies	8	1

Tableau 3 : Etats corporels selon la race.

Activité et mode de vie

Parmi les 95 chiens prélevés :

- 17 sont des chiens de compagnie vivant en appartement et, à l'exception d'un chiot (prélèvement n°42), tous appartiennent à des étudiants vétérinaires,
- 36 vivent en maison avec accès à un jardin,
- 20 sont des chiens de sport ou de travail soumis à une activité physique soutenue et régulière. En effet, 14 pratiquent l'agility au niveau compétition, 4 sont entraînés en obéissance et ring, 2 travaillent sur troupeaux en exploitation agricole.
- 22 chiens sont utilisés pour la chasse au sanglier et vivent en chenil. Les prélèvements sur ces chiens, réalisés en décembre 2004, ont eu lieu en période d'activité.

Répartition des races au sein des groupes d'activité :

Il existe une corrélation entre la race et le type d'activité.

Les chiens de chasse appartiennent tous au même groupe racial (chiens courants) à l'exception d'un seul, croisé Fox Terrier (Figure 9). Réciproquement, les chiens courants sont tous utilisés pour la chasse à l'exception de trois qui sont exclusivement des chiens de compagnie (2 vivant en maison et 1 en appartement).

Si l'on ne tient pas compte de l'activité de chasse, il n'existe pas de corrélation entre la race et l'activité pour les trois autres catégories (Test du Chi 2 sans la catégorie chiens de chasse : $\chi^2 = 17,7262$; $df = 16$; $p = 0,3402$).

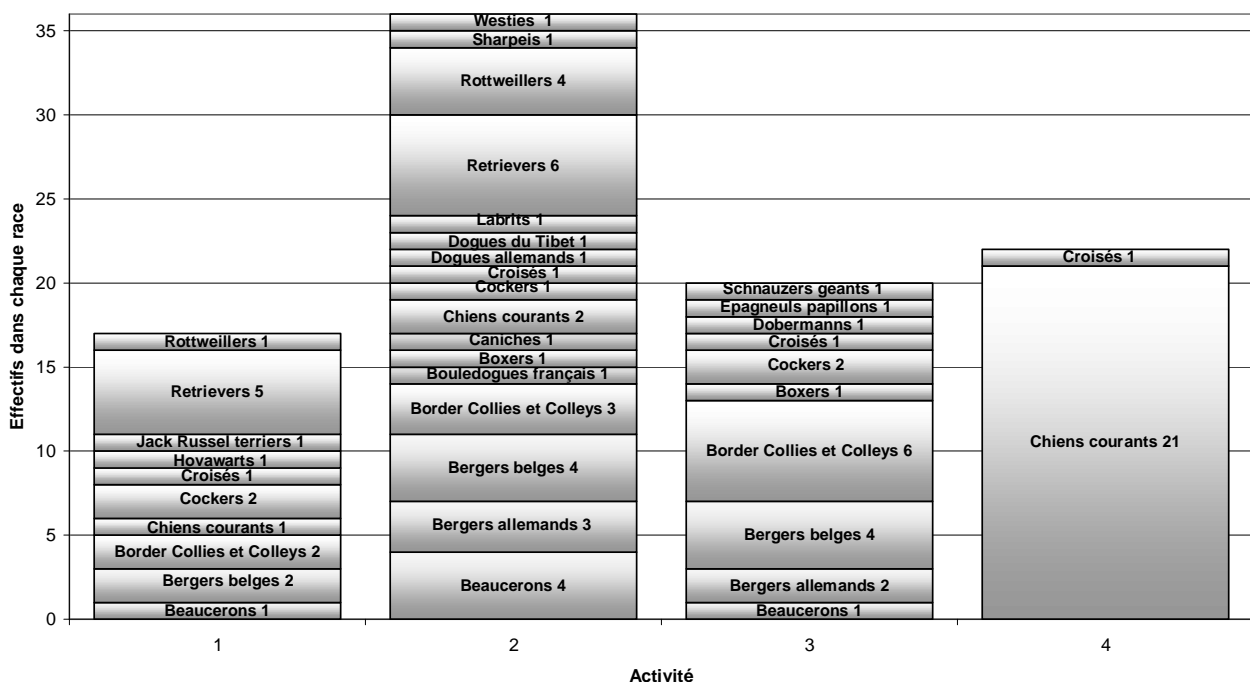


Figure 9 : Effectifs par races selon chaque activité. **Activité** : 1, chiens de compagnie en appartement ; 2, chiens de compagnie en maison avec jardin ; 3, chiens de sport et chiens de travail ; 4, chiens de chasse.

Mode de vie et état d'entretien

L'état corporel varie en fonction du mode de vie (Tableau 4) :

- les chiens d'appartement ont un état corporel moyen idéal (moyenne des BCS 4,18),
- les chiens vivant en maison avec jardin ont en moyenne un léger embonpoint (moyenne des BCS 5,41),
- les chiens de sport sont légèrement maigres (moyenne des BCS 3,75),
- les chiens de chasse sont maigres (moyenne des BCS 2,41).

Activité	BCS	Effectif
1	2	4
	3	1
	4	5
	5	4
	6	1
	7	2
	Total 1	
Moyenne BCS		4,18
Médiane		4
Ecart-type		1,63
2	2	2
	3	3
	4	5
	5	13
	6	3
	7	2
	8	7
	9	1
Total 2		36
Moyenne BCS		5,41
Médiane		5
Ecart-type		2,58

3	1	3
	2	2
	3	4
	4	2
	5	7
	6	1
	7	1
Total 3		20
Moyenne BCS		3,75
Médiane		4
Ecart-type		1,74
4	1	9
	2	3
	3	5
	4	3
	5	1
	6	1
Total 4		22
Moyenne BCS		2,41
Médiane		2
Ecart-type		1,46

Tableau 4 : Etat corporel en fonction de l'activité.

BCS 1 à 9. Activité : 1, chiens de compagnie en appartement ; 2, chiens de compagnie en maison avec jardin ; 3, chiens de sport et chiens de travail ; 4, chiens de chasse.

Alimentation

Type d'alimentation :

38 chiens sur 95 sont nourris en permanence avec des croquettes de qualité premium : 7 chiens reçoivent des croquettes Science diet® (Hill's), 8 mangent des croquettes Proplan® (Purina), 23 des croquettes Size nutrition® (Royal Canin) (Tableau 5).

36 autres chiens sont également nourris exclusivement avec des croquettes. Ces croquettes, achetées en animalerie ou en grande surface proviennent de marques et de gammes très diverses (Flatazor®, Agi+®, Breekies®, Pedigree Pal®...). Compte tenu du grand nombre de marques et des faibles effectifs de chiens nourris avec chacune (un à quatre chiens), l'effet de ces aliments n'a pas pu être étudié spécifiquement. De plus, en ce qui concerne les croquettes achetées en supermarché, certains propriétaires prennent indifféremment une marque ou l'autre et il n'était pas possible de connaître la nature exacte de l'aliment.

6 chiens de chasse sont nourris avec des carcasses de canards crues provenant d'une conserverie proche.

15 chiens sont nourris avec des restes de tables (pain, déchets de viande), du riz ou des pâtes, éventuellement complétés par des aliments industriels pour chiens :

- 11 reçoivent des croquettes, des pâtes ou du riz et des restes de tables,
- 2 mangent un mélange de restes de table, pâtes, croquettes et aliment en boîte,
- 2 ne mangent que des restes de table.

On note qu'aucun chien de l'échantillonnage n'est nourri de façon exclusive avec des aliments humides pour chien. De même, aucun ne reçoit une alimentation ménagère préparée spécifiquement.

Type d'alimentation et BCS :

L'état corporel ne dépend pas du type d'alimentation. L'absence de corrélation est vérifiée par un test du Chi 2 : $\chi^2 = 36,29$; $df = 35$; $p = 0,41$.

Type d'alimentation et mode de vie :

L'alimentation distribuée dépend du mode de vie du chien et de son activité (Tableau 5).

Les chiens d'appartement ainsi que les chiens de sport (à l'exception d'un chien de troupeau) ne reçoivent pas de restes de table.

Les restes de tables ne sont donnés qu'aux chiens vivant en maison avec jardin et aux chiens en chenil.

Aucun chien de chasse n'est nourri avec des croquettes « premium ».

Alimentation		Activité																								Total			
		BCS																											
		1						2						3						4									
2	3	4	5	6	7	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6			
Croquettes diverses ⁽¹⁾		1	1	1		1	1	2	1	1	5	1		3		1	2	1		3	1	1	4	2	1	2			36
Croquettes premium	Hill's	1		1							3	1		1															7
	Purina									1	2			1				1	1	2									8
	Royal canin	2		3	4		1	2	2	2	1					1		2	1	2									23
Carcasses																							1		2	1	1	1	6
Restes ⁽²⁾										1	1		2	2	1	1							4	1	2				15
Total		4	1	5	4	1	2	2	3	5	13	3	2	7	1	3	2	4	2	7	1	1	9	3	5	3	1	1	95

Tableau 5 : Aliment distribué en fonction de l'activité et de l'état corporel.

⁽¹⁾ **Croquettes diverses** : chiens nourris exclusivement avec des croquettes mais dont le détail n'est pas exposé compte tenu du grand nombre de marques représentées et des faibles effectifs pour chacune, et/ou dont la nature n'est pas connue.

⁽²⁾ **Restes** : restes de tables, mélangés ou non à des aliments industriels pour chiens.

Délai depuis le dernier repas

Les chiots de moins de 6 mois sont nourris trois fois par jour. Pour ces animaux, le délai depuis le dernier repas est toujours inférieur à 6 heures (Figure 10).

Pour les chiens plus âgés, les délais vont de 1 à 21 heures.

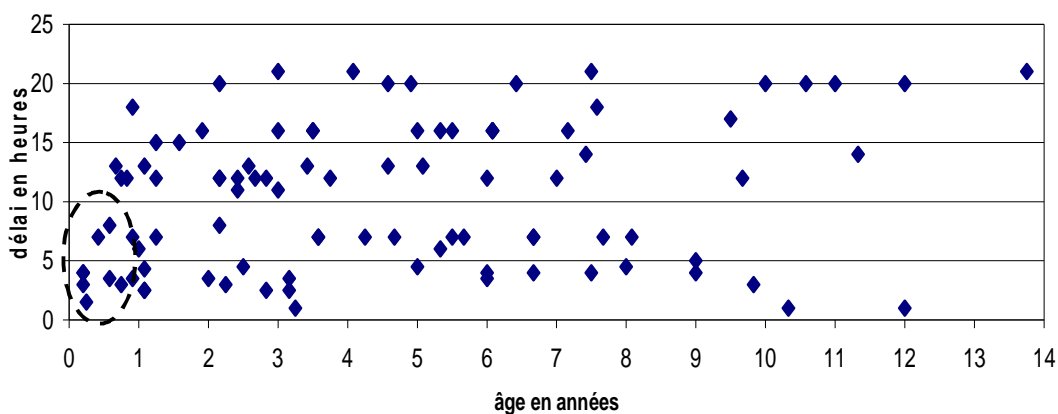


Figure 10 : Délai depuis le dernier repas en fonction de l'âge des chiens.

- - - Dans la classe d'âge « chiots » (]0 - 10 mois]), la majorité des individus a mangé depuis moins de 6 heures et n'est pas à jeûn. Cette distribution ne se retrouve pas chez les adultes.

Etude des profils métaboliques : identification des sources de variation

Les données obtenues par spectroscopie RMN des urines sont contenues dans un tableau comportant 95 lignes correspondant aux 95 chiens et 189 colonnes correspondant aux intégrations relatives avec un pas de 0,04 ppm de l'aire sous le spectre, utilisées comme variables.

Ces variables ont été soit directement analysées en ACP, soit analysées en AFD après filtration pas à pas.

Evolution avec l'âge des profils métaboliques

Analyse en composante principale (ACP)

La représentation graphique par ACP fait apparaître une disposition des points suivant l'âge des chiens selon la diagonale allant du quadrant inférieur droit vers le quadrant supérieur gauche (Figure 11). Les chiots se projettent dans le quart inférieur droit du graphique jusqu'à l'âge de 8-9 mois. On trouve ensuite les jeunes adultes puis les chiens âgés de plus de quatre ans qui se projettent globalement dans le quart supérieur droit.

Pour les chiens de plus de 7 ans, on observe sur le premier plan factoriel un « retour en arrière » par rapport à l'axe de progression observé pour les âges de 0,2 à 7 ans avec des points qui se mélangent avec les jeunes adultes.

L'ACP révèle donc une évolution avec l'âge du profil métabolique, sur les deux premiers axes.

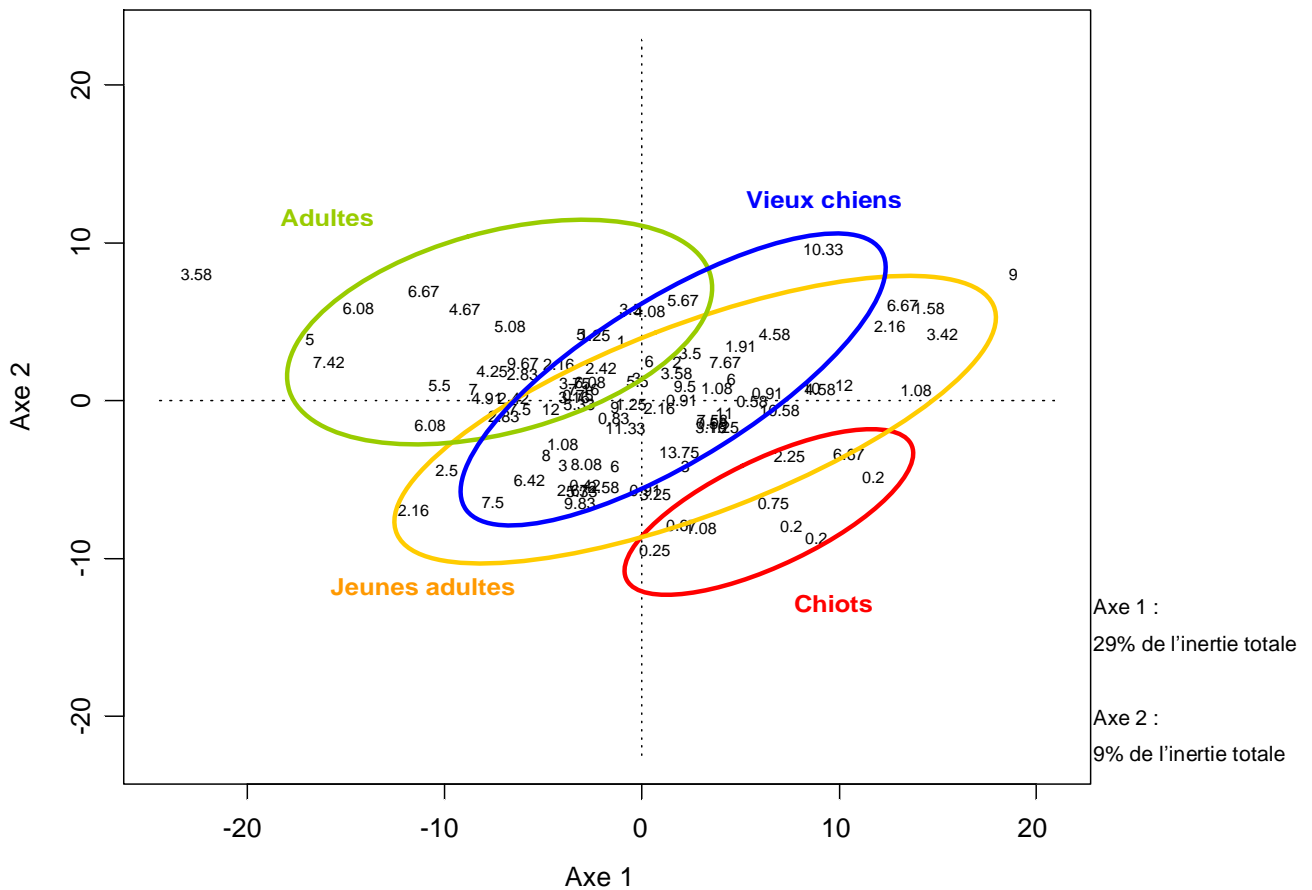


Figure 11 : ACP des animaux. Les étiquettes correspondent à l'âge de chaque chien (en années).

Analyse factorielle discriminante (AFD)

Des classes d'âge ont été établies en fonction des résultats obtenus par ACP et des connaissances sur la physiologie des animaux (Tableau 6), avec :

- 1- les chiots d'âge inférieur ou égal 10 mois,
- 2- les jeunes adultes :] 10 mois - 4 ans],
- 3- les chiens adultes d'âge mûr :] 4 ans – 7 ans],
- 4- les chiens âgés de plus de 7 ans.

Classes	Effectifs	% de l'échantillonnage
1	11	11,5
2	38	40,0
3	24	25,3
4	22	23,2

Tableau 6 : Effectifs des différentes classes d'âge. **1**, chiots de moins de 10 mois ; **2**, jeunes adultes de 10 mois à 4 ans ; **3**, adultes de 4 à 7 ans ; **4**, adultes de plus de 7 ans.

La représentation graphique par AFD montre une opposition du groupe des chiots par rapport aux trois groupes d'adultes selon le premier axe de discrimination factorielle (LD 1), portant 59,6% de la variabilité de l'échantillonnage.

Sur l'axe 2 (LD 2, représentant 26,6% de la variabilité), les groupes d'adultes s'ordonnent par ordre croissant d'âge. Les chiens les plus jeunes en moyenne (0,91 ans) ont les coordonnées les plus faibles, les plus âgés les coordonnées les plus grandes (Figure 12).

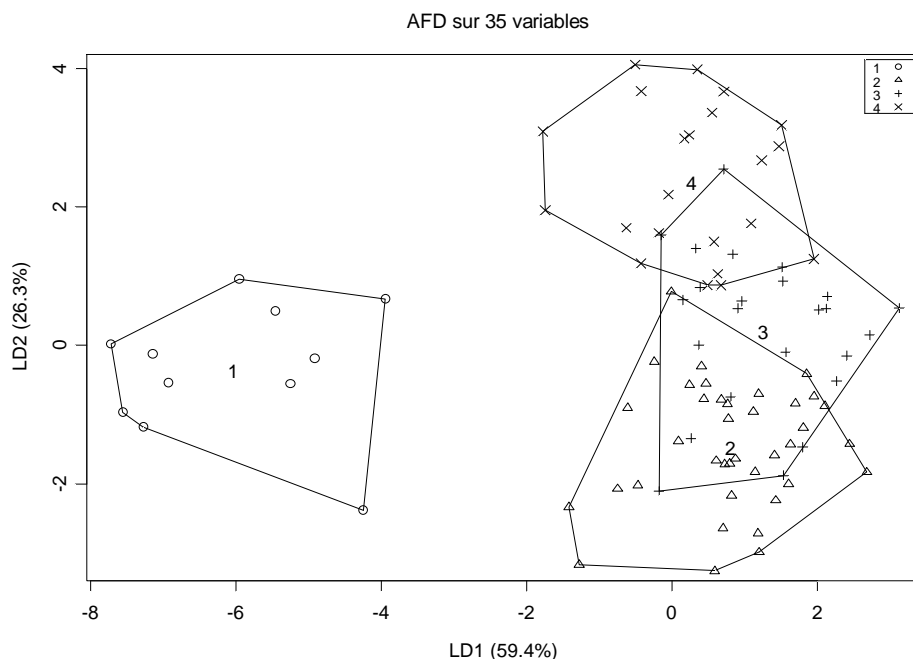


Figure 12 : Séparation des classes d'âge par AFD. **Classes d'âge :** 1, chiots de moins de 10 mois ; 2, jeunes adultes de 10 mois à 4 ans ; 3, adultes de 4 à 7 ans ; 4, adultes de plus de 7 ans.

Les distances entre les différents groupes d'âge sont significatives (probabilités de Mahalanobis très inférieures à 0,05) (Tableaux 7 et 8).

	1	2	3	4
1	0	49,2	55,3	48,8
2	49,2	0	9,03	14,9
3	55,3	9,03	0	12,6
4	48,8	14,9	12,6	0

Tableau 7 : Carrés des distances de Mahalanobis entre les classes d'âge.

	1	2	3	4
1	1,0000	<0,0001	<0,0001	<0,0001
2	<0,0001	1,0000	0,0018	0,0007
3	<0,0001	0,0018	1,0000	0,0007
4	<0,0001	<0,0001	0,0007	1,0000

Tableau 8 : Significativité (probabilités) des distances de Mahalanobis entre les classes d'âge.

Influence de l'état corporel sur les profils métaboliques

Les états corporels 8 et 9 (animaux obèses) ont été regroupés du fait des faibles effectifs dans ces catégories (un seul chien avec la note 9). Le regroupement des notes 8 et 9 est désigné par BCS 8.5 (Tableau 9).

BCS	Effectifs	% de l'échantillonnage
1	12	12,6
2	11	11,6
3	13	13,7
4	15	15,8
5	25	26,3
6	6	6,3
7	5	5,3
8,5	8	8,4

Tableau 9 : Effectifs des niveaux d'états corporels (BCS 1 à 7 et 8,5).

L'analyse factorielle discriminante sur les niveaux d'état corporel ne montre pas de distinction entre les groupes (Figure 13).

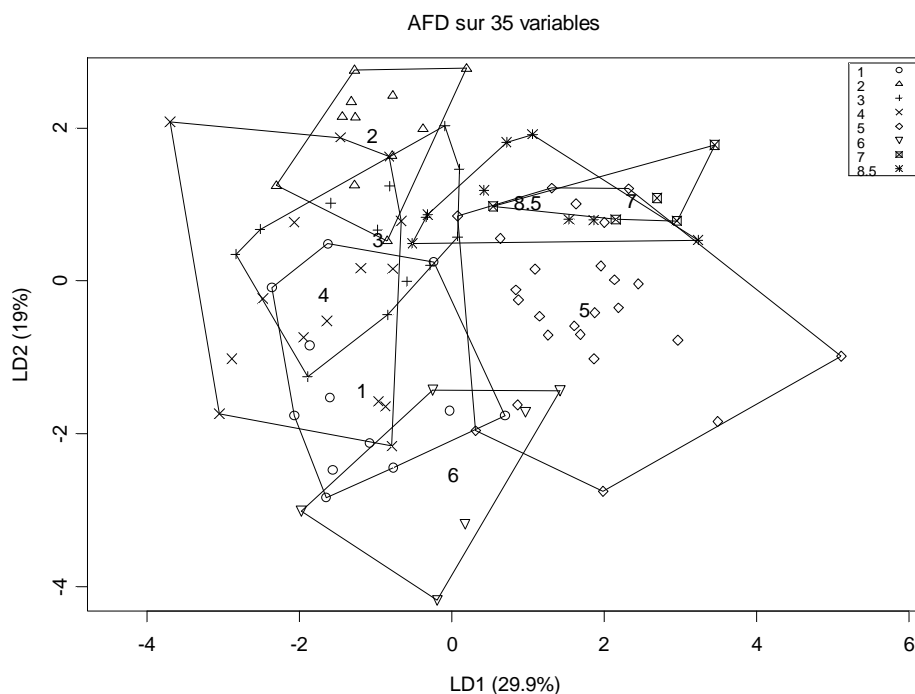


Figure 13 : Représentation des groupes d'état corporel par AFD (BCS 1 à 7 et 8,5).

Le calcul des distances entre les groupes (Tableau 10) ne permet pas de conclure quant à l'existence d'une variation du profil métabolique en fonction du score d'état corporel : les probabilités de Mahalanobis ne sont inférieures à 0.05 que pour quelques distances entre groupes mais sans ordre interprétable en terme de gradation du BCS. Par exemple, le groupe « BCS 1 » est différent du groupe « BCS 2 » mais pas de celui « BCS 3 »....

	1	2	3	4	5	6	7	8,5
1	1	0,0087	0,2102	0,2616	0,0150	0,2352	0,0758	0,0303
2	0,0087	1	0,3741	0,3020	0,0134	0,0257	0,2109	0,0976
3	0,2102	0,3741	1	0,3188	0,0318	0,1519	0,3318	0,1731
4	0,2616	0,3020	0,3188	1	0,0015	0,0778	0,578	0,0204
5	0,0150	0,0134	0,0318	0,0015	1	0,2213	0,5090	0,0526
6	0,2352	0,0257	0,1519	0,0778	0,2213	1	0,2164	0,1233
7	0,0758	0,2109	0,3318	0,5780	0,5090	0,2164	1	0,5276
8,5	0,0303	0,0976	0,1731	0,0204	0,0526	0,1233	0,5276	1

Tableau 10 : Significativité (probabilités) des distances de Mahalanobis entre les groupes d'état corporels (BCS 1 à 7 et 8.5).

Ségrégation selon la race

Pour la réalisation des analyses statistiques portant sur les groupes raciaux, seuls les groupes raciaux de taille suffisante (5 individus et plus) ont été pris en considération, ce qui réduit à 77 le nombre de chiens pris en compte (Tableau 11).

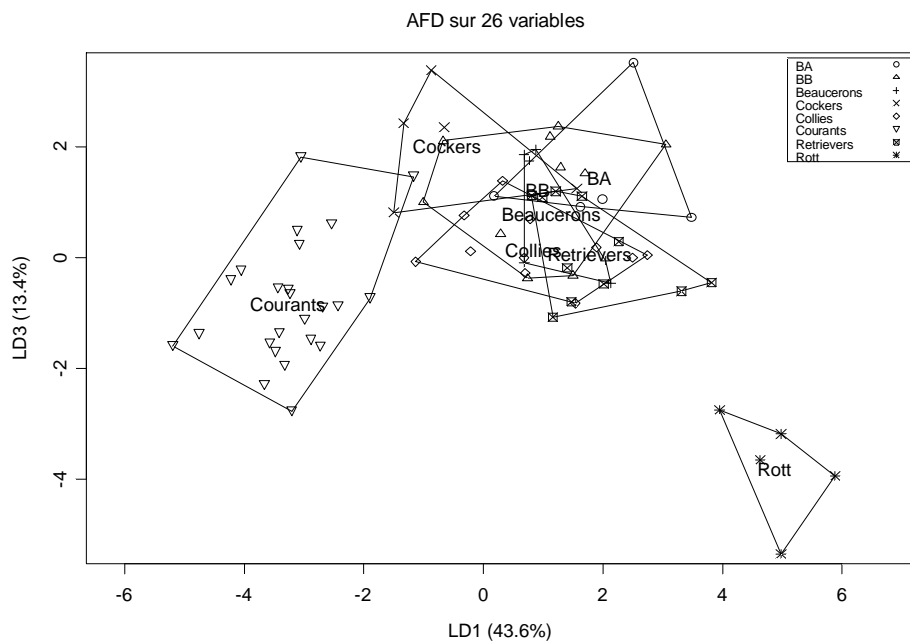
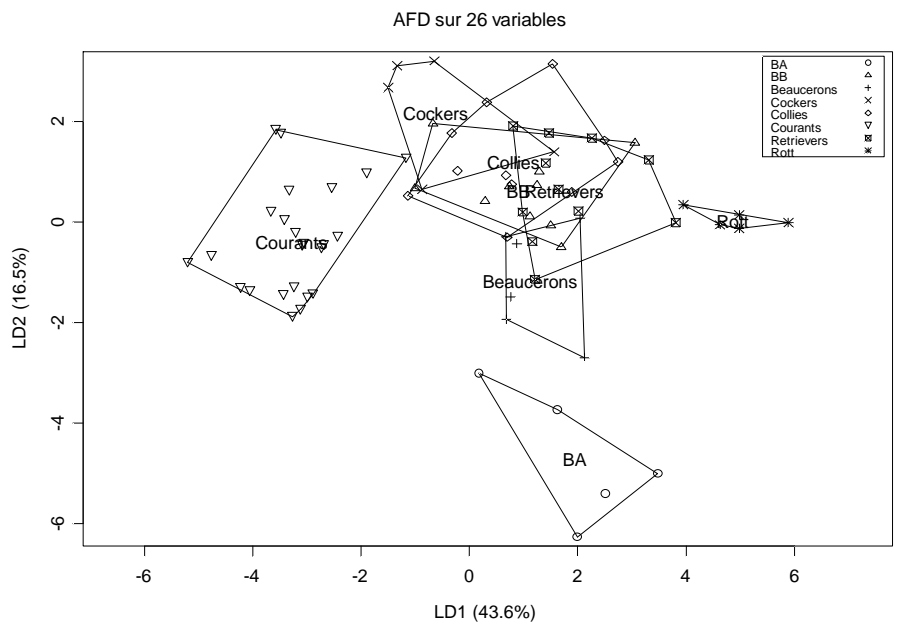
Races	Effectifs	% de l'échantillonnage
Bergers allemands	5	06,5
Bergers belges	10	13,0
Beaucerons	6	7,8
Border collies et colleys	11	14,3
Rottweilers	5	6,5
Chiens courants	24	31,1
Retrievers	11	14,3
Cockers	5	6,5

Tableau 11 : Effectifs des groupes raciaux retenus (Total : 77 chiens).

L'analyse factorielle discriminante permet d'isoler les bergers allemands, les beaucerons, les border collies et colleys, les rottweilers, les chiens courants et les cockers les uns par rapport aux autres.

Sur les représentations graphiques des 3 premiers axes de l'AFD (Figures 14 et 15), on distingue aisément :

- selon l'axe 1, une opposition des chiens courants (coordonnées négatives) et des rottweilers (coordonnées positives) par rapport aux autres races (coordonnées proches de 0),
- selon l'axe 2, une opposition des bergers allemands (coordonnées négatives) par rapport aux autres races,
- selon l'axe 3, une opposition des rottweilers (coordonnées négatives) par rapport aux autres races.



Figures 14 et 15 : Représentation des groupes raciaux par AFD.

Races : BA, bergers allemands ; BB, bergers belges ; Collies, border collies et colleys ; courants, chiens courants ; Rott, rottweilers.

Les distances entre ces groupes (bergers allemands, beaucerons, border collies et colleys, rottweilers, chiens courants et cockers) sont significatives (probabilités de Mahalanobis inférieures à 0.05) (Tableaux 12 et 13).

Les bergers belges et les retrievers peuvent être isolés par rapport aux autres races. Par contre, ces deux groupes ne sont pas significativement différents l'un de l'autre ($p = 0.23$) (Tableaux 12 et 13).

	Bergers allemands	Bergers belges	Beaucerons	Border collies, colleys	Rottweilers	Chiens courants	Retrievers	Cockers
Bergers allemands	0	39,01	35,20	42,70	62,13	53,28	36,97	61,94
Bergers belges	39,01	0	22,07	15,18	47,90	26,75	9,98	25,87
Beaucerons	35,20	22,07	0	22,31	47,71	34,07	23,69	34,48
Border collies, colleys	42,70	15,18	22,31	0	41,73	23,53	13,51	22,53
Rottweilers	62,13	47,90	47,71	41,73	0	76,62	33,80	72,34
Chiens courants	53,28	26,75	34,07	23,53	76,62	0	30,99	31,01
Retrievers	36,97	9,98	23,69	13,51	33,80	30,99	0	28,93
Cockers	61,94	25,87	34,48	22,53	72,34	31,01	28,93	0

Tableau 12 : Carré des distances de Mahalanobis entre les groupes raciaux.

	Bergers allemands	Bergers belges	Beaucerons	Border collies, colleys	Rottweilers	Chiens courants	Retrievers	Cockers
Bergers allemands	1	0,0003	0,006	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0004	<0,0001
Bergers belges	0,0003	1	0,0187	0,0247	<0,0001	<0,0001	0,2285	0,0139
Beaucerons	0,0006	0,0187	1	0,0134	0,0003	<0,0001	0,0085	0,0071
Border collies, colleys	<0,0001	0,0247	0,0134	1	0,0001	<0,0001	0,0387	0,0296
Rottweilers	<0,0001	<0,0001	0,0003	0,0001	1	<0,0001	0,0011	<0,0001
Chiens courants	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	1	<0,0001	0,0004
Retrievers	0,0004	0,2285	0,0085	0,0387	0,0011	<0,0001	1	0,0044
Cockers	<0,0001	0,0139	0,0071	0,0296	<0,0001	0,0004	0,0044	1

Tableau 13 : Significativité (probabilités) des distances de Mahalanobis entre les groupes raciaux.

Effets de l'alimentation

L'analyse factorielle discriminante a été réalisée sur les groupes établis d'après le type d'alimentation : croquettes Science diet® (Hill's), croquettes Proplan® (Purina), croquettes Size nutrition® (Royal Canin), carcasses de canard, croquettes diverses, restes de tables mélangés ou non à des aliments industriels pour chiens (Tableau 14).

Alimentation	Effectifs	% de l'échantillonnage
Croquettes Hill's	7	7,4
Croquettes Purina	8	8,4
Croquettes Royal Canin	23	24,2
Carcasses de canard	6	6,3
Croquettes diverses	36	37,9
Restes	15	15,8

Tableau 14 : Effectifs des groupes de chiens recevant le même type d'alimentation.

Sur la représentation graphique (Figure 16), le premier axe de discrimination factorielle LD1 (portant 54,4% de la variabilité entre les groupes) permet un isolement net des chiens nourris avec des carcasses de canard (coordonnées positives).

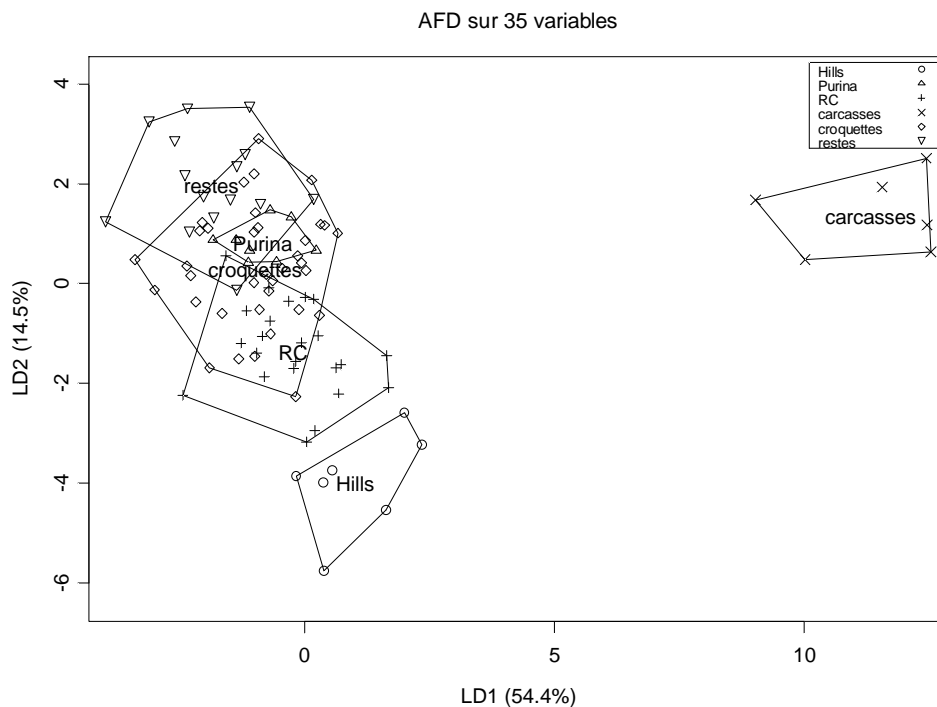
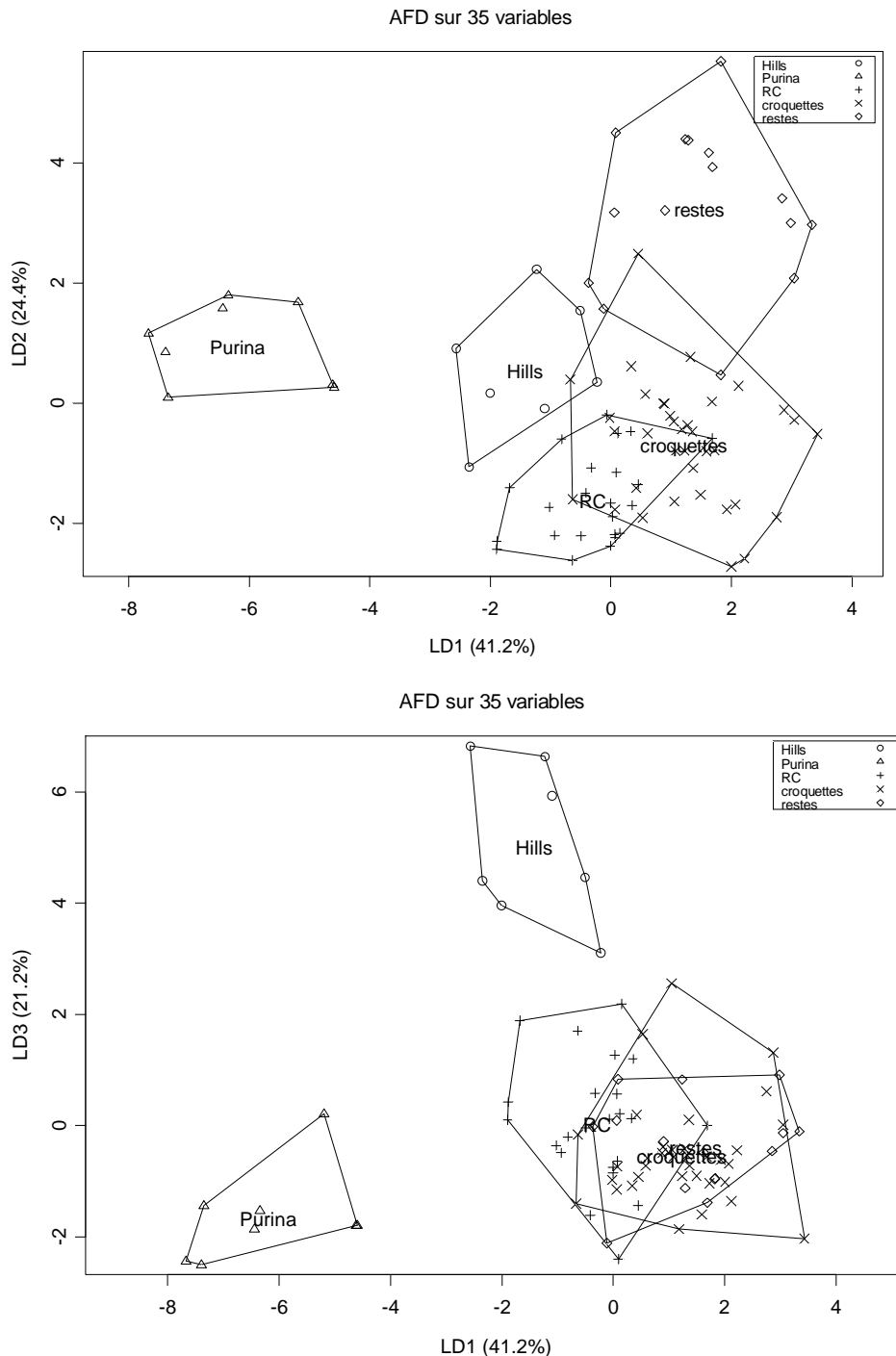


Figure 16 : Ségrégation selon l'alimentation par AFD (tous les chiens).

Alimentation : **Purina**, croquettes Purina Proplan® ; **Hill's**, croquettes Hill's Science diet® ; **RC**, croquettes Royal canin Size nutrition® ; **carcasses**, carcasses de canard ; **croquettes**, croquettes diverses ; **restes**, restes de table mélangés ou non à des aliments industriels pour chiens.

Sur les figures 17 et 18, l'AFD a été refaite après avoir retiré le groupe nourri avec des carcasses de canard afin d'étaler la projection des groupes restants. Les chiens nourris avec des croquettes Purina Proplan® (LD 1 : 41,2%) et ceux nourris avec des croquettes Hill's Science diet® (LD 3 : 21,2%) sont séparés des autres groupes.



Figures 17 et 18 : Ségrégation selon l'alimentation par AFD en retirant le groupe « carcasses de canard » afin de visualiser les distances entre les autres groupes.

Alimentation : Purina, croquettes Purina Proplan® ; Hill's, croquettes Hill's Science diet® ; RC, croquettes Royal canin Size nutrition® ; croquettes, croquettes diverses ; restes, restes de table mélangés ou non à des aliments industriels pour chiens.

Les distances entre les six groupes de chiens établis sur le régime alimentaire sont toutes significatives (probabilités de Mahalanobis très inférieures à 0,05) (Tableau 15).

	Croquettes Hill's	Croquettes Purina	Croquettes Royal canin	Carcasses de canard	Croquettes diverses	Restes
Croquettes Hill's	1	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Croquettes Purina	<0,0001	1	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Croquettes Royal Canin	<0,0001	<0,0001	1	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Carcasses de canard	<0,0001	<0,0001	<0,0001	1	<0,0001	<0,0001
Croquettes diverses	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	1	0,0002
Restes	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0002	1

Tableau 15 : Significativité (probabilités) des distances de Mahalanobis entre les groupes de chiens recevant le même type d'alimentation.

Effets du mode de vie

Une AFD est réalisée à partir des quatre groupes établis en fonction du mode de vie, avec :

1. les chiens de compagnie vivant en appartement,
2. les chiens de compagnie vivant en maison avec jardin,
3. les chiens de travail et de sport,
4. les chiens de chasse (Tableau 16).

Activité	Effectifs	% de l'échantillonnage
1	17	18,0
2	36	37,8
3	20	21,1
4	22	23,2

Tableau 16 : Effectifs des groupes de chiens en fonction du mode de vie.

Mode de vie : 1, vie en appartement ; 2, vie en maison avec jardin ; 3, chiens de sport ; 4, chiens de chasse.

L'analyse factorielle discriminante des groupes établis sur le mode de vie montre une grande différence entre les chiens de chasse vivant en chenil (groupe 4) et les trois autres groupes de chiens (chiens d'appartement, chiens en maison et chien de sport) : cette opposition est matérialisé sur l'axe 1 de la représentation graphique (65,7% de la variabilité inter-groupes).

L'axe 2 (LD 2 : 20,3%) oppose le groupe 3 (chiens de travail) aux groupes 1 et 2 (chiens de compagnie en appartement et en maison) (Figure 19).

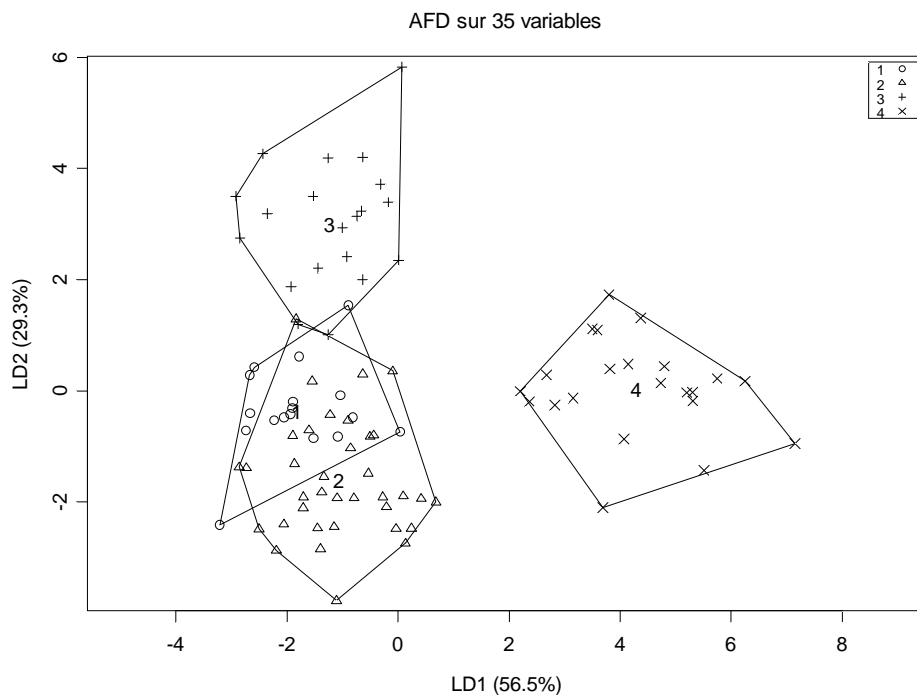


Figure 19 : Ségrégation selon le mode de vie par AFD.

Mode de vie : 1, vie en appartement ; 2, vie en maison avec jardin ; 3, chiens de sport ; 4, chiens de chasse.

Les distances entre les groupes sont toutes significatives (probabilités de Mahalanobis très inférieures à 0,05) (Tableau 17).

	1	2	3	4
1	1	0,0048	0,0004	<0,0001
2	0,0048	1	<0,0001	<0,0001
3	0,0004	<0,0001	1	<0,0001
4	<0,0001	<0,0001	<0,0001	1

Tableau 17 : Significativité (probabilités) des distances de Mahalanobis entre les groupes de chiens de mode de vie identique.

Mode de vie : 1, vie en appartement ; 2, vie en maison avec jardin ; 3, chiens de sport ; 4, chiens de chasse.

Identification des principaux composés différenciant les spectres

L'analyse en spectroscopie RMN des urines de différentes espèces de laboratoire et de l'homme a fait l'objet de diverses études. L'allure des spectres commence à être connue et les déplacements chimiques des principaux métabolites rencontrés dans l'urine ont été identifiés.

Aussi est-il possible, par comparaison avec les données bibliographiques, d'attribuer à de nombreuses zones de résonances les composés impliqués, sur la base du déplacement chimique et de la multiplicité du signal.

Le déplacement chimique étant une propriété intrinsèque de la molécule, la comparaison de spectres d'urines provenant d'espèces animales différentes n'est pas problématique.

En annexe 4, un tableau récapitule les principaux composés isolés dans les urines des espèces de laboratoire et de l'homme et pour lesquels les déplacements chimiques en spectroscopie RMN du proton ont été identifiés.

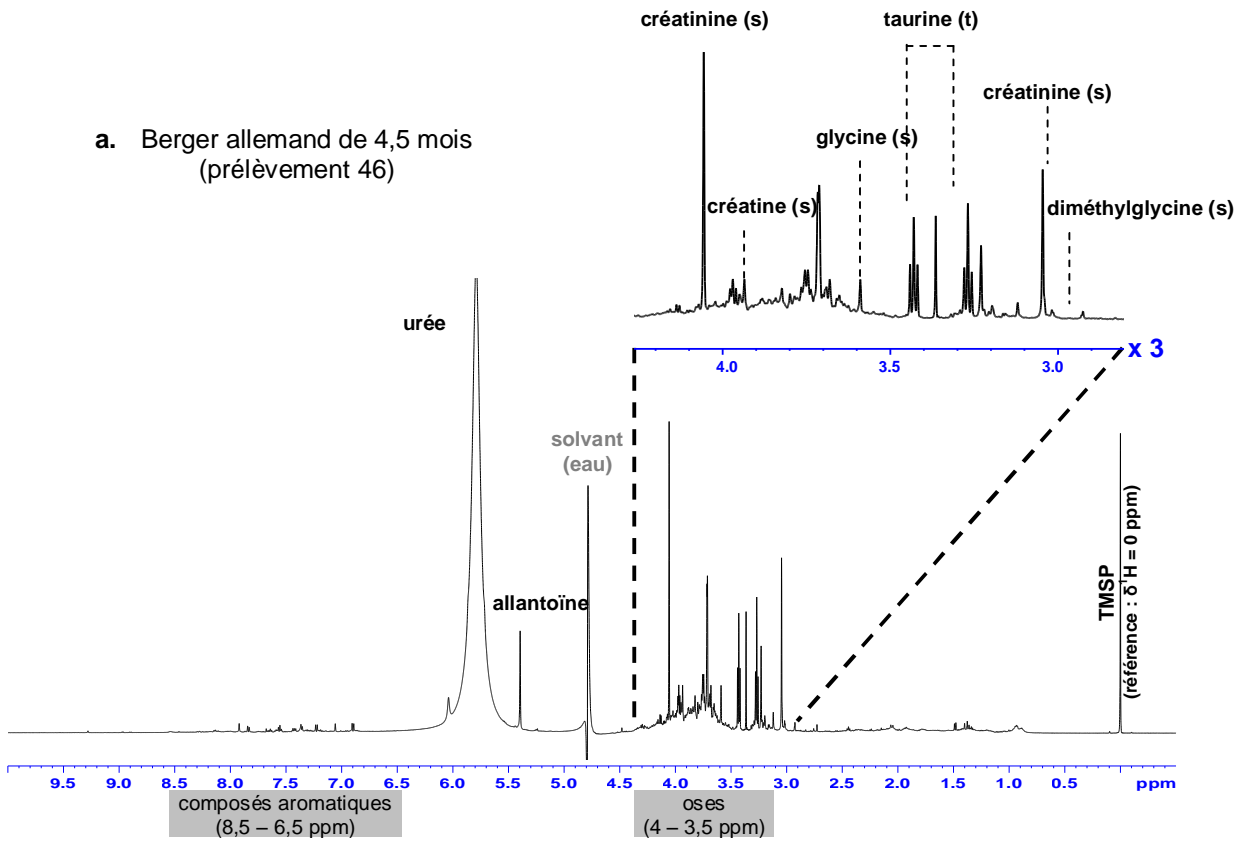
Analyse des spectres

Trois exemples de spectres d'urines sont reproduits ci-après avec quelques uns des pics identifiés (Figures 20a, 20b et 20c).

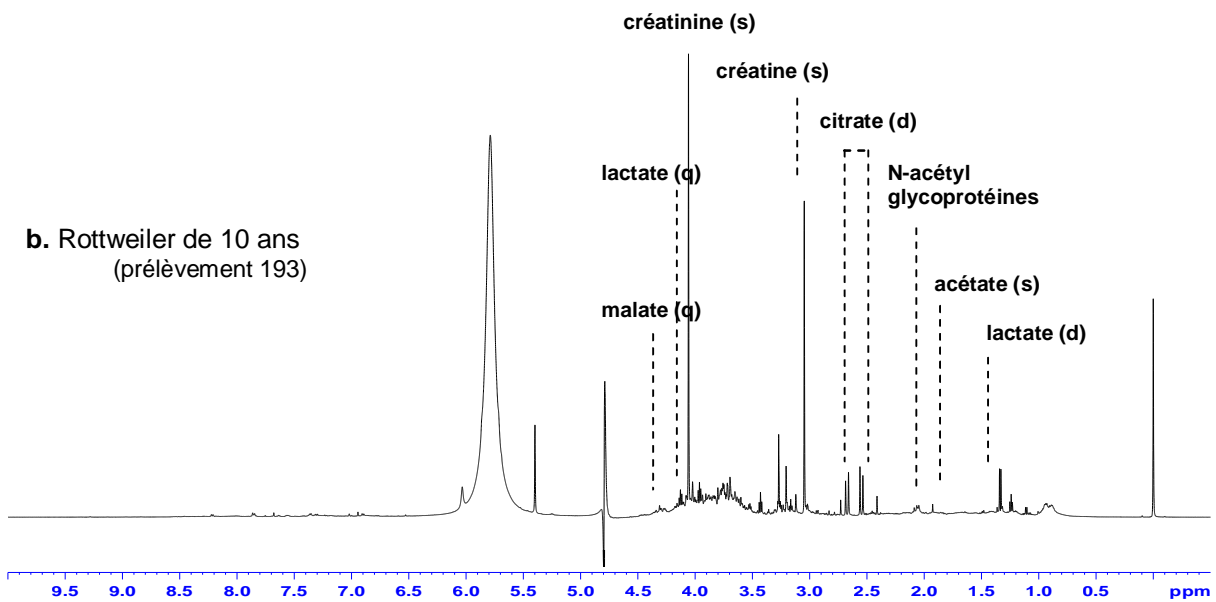
Certains pics peuvent être attribués aux composés correspondants par comparaison avec les données bibliographiques. Par exemple, on trouve de façon quasi-constante l'association de deux triplets, de déplacements chimiques 3,28 ppm et 3,42 ppm, sur les spectres d'urine de chien. Ces signaux sont compatibles avec l'hypothèse d'une résonance de la taurine (Gavaghan et *al.*, 2000).

Par contre, de nombreux pics, de taille relative plus ou moins importantes n'ont pas pu être identifiés. Il n'a pas toujours été possible de mettre en relation les signaux observés pour retrouver les éléments correspondant au signal de résonance d'une molécule. De plus, certains de ces pics sont absents ou non connus sur les spectres d'urine de souris utilisés pour la comparaison.

a. Berger allemand de 4,5 mois
(prélèvement 46)



b. Rottweiler de 10 ans
(prélèvement 193)



c. Grand Bleu de Gascogne de 7,6 ans
(prélèvement 73)

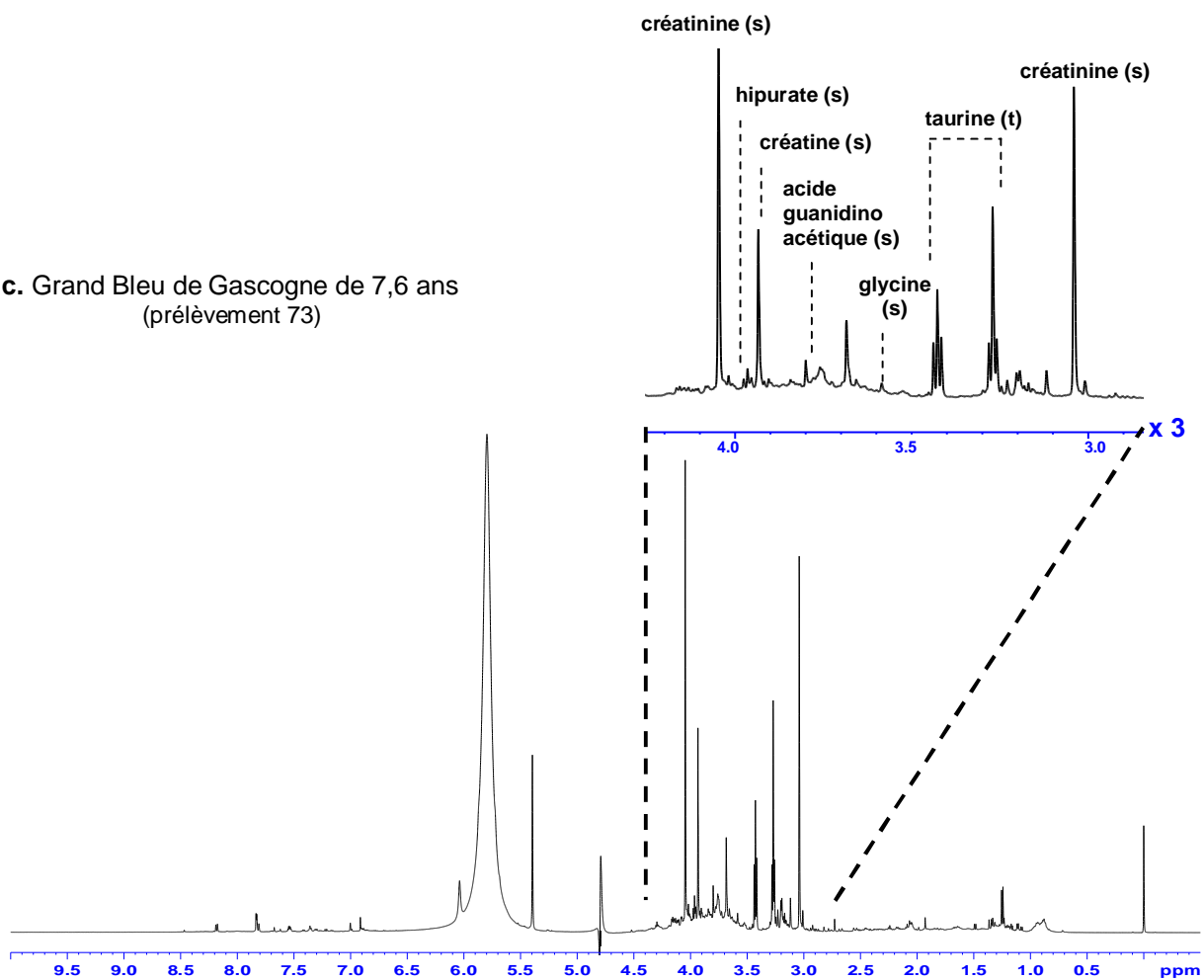


Figure 20 : Spectre d'urines de chiens en spectroscopie RMN du proton ^1H .

a. berger allemand de 4,5 mois,

b. rottweiler de 10 ans,

c. grand bleu de Gascogne de 7,6 ans.

s, singulet ; d, doublet ; t, triplet ; q, quintet.

Composés correspondant aux variables sélectionnées en AFD

Pour la suite, nous nous sommes intéressés aux résultats des analyses factorielles discriminantes. En effet, la complexité des spectres et la grande variété de facteurs de variations mis en jeu rendent difficile la comparaison *de visu*. Or, les variables sélectionnées par AFD correspondent à des portions d'intégration spectrale dont on connaît la position par le biais du déplacement chimique. L'étude des variables les plus fortement impliquées dans les différents types de ségrégation testés (âge, BCS, race, alimentation, activité) permet donc d'accéder aux zones du spectre significativement modifiées. L'importance relative de chaque variable dans la séparation des classes est évaluée à partir des corrélations canoniques avec les directions factorielles.

Age

Les variables responsables la ségrégation entre les chiots et les adultes ont des corrélations canoniques importantes avec le premier axe de discrimination factorielle (LD 1) alors que les variables intéressantes pour la ségrégation selon l'âge chez les adultes ont des corrélations canoniques importantes avec le deuxième axe de discrimination factorielle (LD 2) (*vide supra*, Figure 12).

Quelques composés correspondant à ces variables ont pu être identifiés à partir du déplacement chimique correspondant au centre de l'intervalle d'intégration associé à chaque variable (Tableau 18). Dans certains cas, plusieurs composés correspondant au même déplacement chimique ont été proposés.

Ainsi, il semblerait que les urines des chiots contiennent davantage de 2-hydroxyglutarate, d'acide hydroxyphénylpropionique (3-HPPA et 4-HPPA), de diméthylglycine, de dihydroxyacétone et de pyruvate, alors que celles des adultes contiennent davantage de lactate, de β -alanine, de créatine, de créatinine et de 2-oxoisovalérate.

Parmi les adultes, les urines des plus jeunes contiennent davantage d'isoleucine (ou de valine, la distinction entre les deux n'a pas été établie), de phénylalanine (ou de phénylacétylglycine), de taurine, d'oxaloacétate et de malate, tandis que chez les plus âgés, les concentrations en citrate et en glucose (ou en créatine, bétaine, ou phénylacétylglycine) sont plus élevées.

δ^1H (ppm)	Variables	Métabolites hypothétiques associés	Can 1	rang 1	Can 2	rang 2	Evolution avec l'âge
1,30	V169	lactate	0,95	1	0,29	25	↑
8,62	V35	?	0,95	2	-0,14	33	↑
2,02	V151	2-hydroxyglutarate	-0,95	3	-0,31	24	↓
3,74	V108	diméthylglycine ou citrulline (?)	-0,94	4	-0,27	26	↓
7,22	V70	4-HPPA	-0,94	5	-0,35	23	↓
3,18	V122	β -alanine ou citrulline (?)	0,93	6	0,19	29	↑
6,74	V82	3-HPPA	-0,89	7	-0,45	19	↓
1,10	V174	2-oxoisovalérate	0,89	8	0,44	20	↑
8,74	V32	?	0,88	9	-0,05	35	↑
3,06	V125	créatine ou créatinine (?)	0,88	10	-0,48	18	↑
2,38	V142	pyruvate ou malate (?)	-0,88	11	-0,43	21	↓
4,40	V93	dihydroxyacétone	-0,84	12	-0,53	17	↓
3,46	V115	taurine	-0,17	34	-0,98	1	↓
7,34	V67	phénylalanine ou phénylacétylglycine (?)	-0,21	32	-0,98	2	↓
1,02	V176	isoleucine ou valine (?)	-0,31	31	-0,95	3	↓
1,38	V167	?	-0,17	35	-0,89	4	↓
3,78	V107	glucose ou phénylacétylglycine (?)	-0,41	30	0,77	5	↑
2,54	V138	citrate	0,2	33	0,72	6	↑
3,66	V110	glucose ou phénylacétylglycine (?)	-0,54	26	0,71	7	↑
4,30	V94	malate	-0,74	20	-0,68	8	↓
6,90	V78	tyrosine ou 3-HPPA (?)	-0,73	21	-0,68	9	↓
2,34	V143	oxaloacétate	-0,72	23	-0,67	10	↓
4,42	V91	?	-0,66	25	-0,66	11	↓
3,90	V104	créatine ou glucose ou bétaine (?)	-0,53	27	0,63	12	↑

Tableau 18 : Variables les plus importantes pour chacun des deux axes principaux de l'AFD réalisée avec les classes d'âge.

Can 1 et Can 2 : corrélations canoniques avec l'axe 1 et 2 de l'AFD

rang 1 et rang 2 : rang de la variable lors du classement par ordre décroissant des corrélations canoniques avec l'axe 1 et l'axe 2 de l'AFD

Evolution avec l'âge : augmentation (↑) ou diminution (↓) des concentrations en métabolites dans les urines des chiens les plus vieux par rapport aux chiens les plus jeunes

Races

Quelques composés différenciant les spectres des animaux de trois groupes raciaux - les bergers allemands, les rottweilers et les chiens courants - ont été identifiés. En effet, les trois premiers axes de discrimination permettant de séparer nettement ces trois races (*vide supra*, Figure 14 et 15) et les corrélations canoniques avec ces axes des variables sélectionnées ont pu être exploitées (Tableau 19).

Ainsi, l'urine des chiens courants contient davantage de diméthylglycine et de méthylmalonate ; moins de glycine et de thréonine. Chez les bergers allemands, on trouve davantage de lactate et moins de citrate, d'isoleucine (ou de valine) et de thréonine. Chez les rottweilers, on trouve davantage de citrate, de pyruvate, et de méthylmalonate et moins de lactate et de créatinine.

δ^1H (ppm)	Variables	Composés	Can 1	rang 1	Can 2	rang 2	Can 3	rang 3	CC	BA	Rott
2,94	V128	diméthylglycine ou créatinine (?)	-0,88	1	-0,20	19	-0,33	7	↑	↑	↑
4,22	V96	thréonine	0,88	2	0,19	20	0,05	22	↓	↓	↓
4,26	V95	thréonine (?)	0,87	3	0,28	10	-0,01	26	↓	↓	↑
3,58	V112	glycine	0,82	4	0,22	17	-0,04	23	↓	↓	↑
1,34	V168	lactate	0,25	18	-0,52	1	0,49	3	↓	↑	↓
2,62	V136	2-oxoisocaproate	0,16	22	0,51	2	0,21	12	↓	↓	↓
4,18	V97	thréonine	0,77	7	0,46	3	0,16	16	↓	↓	↓
1,22	V171	3D-hydroxybutyrate (?)	-0,41	14	0,43	4	0,02	24	↑	↓	↓
1,02	V176	isoleucine ou valine (?)	0,68	10	0,43	5	-0,39	6	↓	↓	↑
2,58	V137	citrate	0,18	21	0,24	14	-0,80	1	↓	↓	↑
4,06	V100	créatinine	0,38	16	-0,17	23	0,63	2	↓	↑	↓
1,26	V170	méthylmalonate	-0,78	5	0,31	9	-0,47	4	↑	↓	↑
2,38	V142	pyruvate ou malate (?)	0,25	17	-0,23	16	-0,45	5	↓	↑	↑

Tableau 19 : Variables les plus importantes pour chacun des deux axes principaux de l'AFD réalisée avec les groupes raciaux.

Can 1, 2 et 3 : corrélations canoniques avec l'axe 1, l'axe 2 et l'axe 3 de l'AFD

rang 1, 2 et 3 : rang de la variable lors du classement par ordre décroissant des corrélations canoniques selon l'axe 1, l'axe 2 et l'axe 3 de l'AFD

CC : augmentation (↑) ou diminution (↓) des concentrations du composé correspondant dans l'urine des chiens courants par rapport aux autres races

BA : augmentation (↑) ou diminution (↓) des concentrations du composé correspondant dans l'urine des bergers allemands par rapport aux autres races

Rott : augmentation (↑) ou diminution (↓) des concentrations du composé correspondant dans l'urine des rottweilers par rapport aux autres races

Alimentation

Les chiens nourris avec de carcasses de canard présentent dans leurs urines davantage de créatine et créatinine, de 2-hydroxyglutarate et de taurine (Tableau 20).

δ^1H (ppm)	Variables	Composés	Can 1	rang 1	Alimentation canard
3,94	V103	créatine ou hippurate (?)	0,94	1	↑
3,02	V126	créatinine et créatinine (?)	0,91	2	↑
3,62	V111	glucose ou glycine (?)	-0,91	3	↓
3,18	V122	β -alanine ou citrulline (?)	0,89	4	↑
3,50	V114	glucose	-0,88	5	↓
1,46	V165	alanine	-0,87	6	↓
1,26	V170	méthylmalonate	0,86	7	↑
2,26	V145	2-hydroxyglutarate	0,84	8	↑
3,42	V116	taurine	0,83	9	↑
2,82	V131	3-HPPA	-0,80	10	↓

Tableau 20 : Variables les plus importantes selon l'axe 1 de l'AFD réalisée avec les groupes de chiens recevant la même alimentation.

Alimentation canard : augmentation (↑) ou diminution (↓) des concentrations du composé correspondant dans l'urine des chiens nourris avec des carcasses de canard par rapport aux autres chiens

Chez les chiens nourris avec des croquettes Purina Proplan®, on trouve davantage de tyrosine, de lactate, de dihydroxyacétone, de malate et de 2-hydroxyglutarate.

Chez les chiens nourris avec Hill's Science diet®, on trouve davantage d'acides biliaires et moins de 3D-hydroxybutyrate, de créatine, de créatinine et de citrate (Tableau 21).

δ^1H (ppm)	Variables	Composés	Can 1	rang 1	Can 3	rang 3	PP	H
7,18	V71	tyrosine	-0,95	1	0,02	35	↑	↑
7,14	V72	tyrosine	-0,90	2	0,37	20	↑	↑
4,14	V98	lactate	-0,88	3	-0,18	28	↑	↓
4,34	V93	dihydroxyacétone	-0,82	4	-0,47	14	↑	↓
4,26	V95	malate	-0,80	5	-0,54	10	↑	↓
2,30	V144	2-hydroxyglutarate	-0,73	6	-0,43	16	↑	↓
1,98	V152	2-hydroxyglutarate	-0,58	7	-0,54	11	↑	↓
4,38	V92	dihydroxyacétone	-0,57	8	-0,76	5	↑	↓
4,30	V94	malate	-0,55	9	-0,68	7	↑	↓
2,34	V143	oxaloacétate	-0,53	10	-0,34	21	↑	↓
2,58	V137	citrate	-0,15	27	-0,89	1	↑	↓
0,70	V184	acides biliaires	-0,03	33	0,84	2	↑	↑
4,02	V101	créatinine ou créatine (?)	-0,22	23	-0,80	3	↑	↓
0,66	V185	acides biliaires	0,04	30	0,78	4	↓	↑
1,22	V171	3D-hydroxybutyrate	0,10	29	-0,76	6	↓	↓
0,50	V189	?	-0,01	34	0,66	8	↑	↑
1,18	V172	3D-hydroxybutyrate (?)	-0,03	32	-0,65	9	↑	↓

Tableau 21 : Variables les plus importantes selon l'axe 1 et 3 de l'AFD réalisée avec les groupes de chiens recevant la même alimentation et pour laquelle on a retiré groupe des chiens nourris avec des carcasses de canard.

PP et H : augmentation (↑) ou diminution (↓) des concentrations du composé correspondant dans l'urine des chiens nourris avec des croquettes Purina Proplan® (PP) ou Hill's Science diet® (H) par rapport aux autres chiens.

Activité

L'urine des chiens de chasse contient davantage de diméthylglycine (ou de créatinine), de citrulline, de 3D-hydroxybutyrate, de créatine et de créatinine et moins de glucose, de glycine, de lactate, d'isoleucine (ou de valine) que celle des autres chiens.

L'urine des chiens de travail contient davantage d'hippurate, de créatine, de créatinine et de lactate et moins de phénylalanine que celle des autres groupes de chiens.

Chez les chiens d'appartement, on trouve davantage de 3-aminoisovalérate, de taurine, de malate et moins de 2-oxoisovalérate (Tableau 22).

δ^1H (ppm)	Variables	Composés	Can1	rang1	Can2	rang2	Can 3	rang3	chasse	sport	appt
2,94	V128	diméthylglycine ou créatinine (?)	1,00	1	-0,02	34	0,00	35	↑	↓	→
1,54	V163	citrulline	0,98	2	-0,18	31	-0,03	28	↑	↓	↓
3,70	V109	glucose ou phénylacétylglycine (?)	-0,98	3	0,16	33	-0,11	23	↓	↑	↓
1,26	V170	3D-hydroxybutyrate	0,97	4	0,01	35	0,23	17	↑	↑	↑
3,54	V113	glycine	-0,96	5	-0,25	29	0,13	22	↓	↓	↑
3,58	V112	glycine	-0,95	6	-0,29	28	0,11	24	↓	↓	↑
4,14	V98	lactate	-0,92	7	0,38	24	0,07	27	↓	↑	↑
4,22	V96	thréonine (?)	-0,91	8	-0,40	22	0,14	19	↓	↓	↑
1,02	V176	isoleucine ou valine (?)	-0,90	9	-0,29	27	0,33	12	↓	↓	↑
3,02	V126	créatine ou créatinine (?)	0,87	10	0,44	21	-0,21	18	↑	↑	↓
7,70	V58	hippurate	-0,05	35	0,93	1	-0,35	11	↓	↑	↓
1,78	V157	2-hydroxyglutarate (?)	-0,42	31	-0,90	2	0,08	25	↓		↑
8,58	V36	?	0,53	26	0,84	3	-0,07	26	↑	↑	↓
7,30	V68	phénylalanine ou 3-HPPA ou tryptophane ou histidine (?)	0,53	27	-0,84	4	0,14	20	↑	↓	↑
8,62	V35	?	0,41	32	0,84	5	0,36	10	↑	↑	↑
4,06	V100	créatinine	-0,49	29	0,81	6	-0,32	14	↓	↑	↓
1,34	V168	lactate	-0,29	34	0,81	7	-0,52	6	↓	↑	↓
7,38	V66	phénylalanine ou phénylacétylglycine (?)	-0,33	33	-0,80	8	0,49	7	↓	↓	↑
8,70	V33	?	0,53	28	0,79	9	0,31	15	↑	↑	↑
8,74	V32	?	0,62	24	0,78	10	-0,03	30	↑	↑	↓
1,38	V167	3-aminoisovalérate	-0,68	20	0,19	30	0,71	1	↓	↑	↑
3,46	V115	taurine	-0,54	25	-0,47	20	0,69	2	↓	↓	↑
4,30	V94	malate	-0,71	18	-0,34	26	0,62	3	↓	↓	↑
4,46	V90	?	-0,82	14	-0,17	32	0,55	4	↓	↓	↑
7,42	V65	?	-0,47	30	-0,71	15	0,52	5	↓	↓	↑
1,10	V174	2-oxoisovalérate	0,84	13	0,35	25	-0,42	8	↑	↑	↓
4,42	V91	?	-0,77	16	-0,51	18	0,39	9	↓	↓	↑

Tableau 22 : Variables les plus importantes pour chacun des trois premiers axes de l'AFD réalisée à partir des groupes de chien avec un mode de vie similaire

chasse, sport, appt : augmentation (↑) ou diminution (↓) des concentrations du composé correspondant dans l'urine des chiens de chasse (**chasse**), de travail (**travail**), ou vivant en appartement (**appt**).

La réalisation de signatures biologiques à partir des urines prélevées chez les 95 chiens mâles de l'échantillon a montré des ségrégations significatives entre des groupes, fondés sur différents critères.

D'abord, la composition des urines varie de façon significative avec l'âge. Deux types d'évolution en fonction de l'âge ont ainsi été mises en évidence : une séparation entre les chiots et les adultes, d'une part, suivie d'une évolution selon l'âge chez les adultes d'autre part. Par contre, contrairement à notre hypothèse de départ, l'état d'entretien ne semble pas influencer le profil métabolique.

Par ailleurs, la plupart des groupes raciaux de notre échantillonnage ont pu être séparés (bergers allemands, beaucerons, border collies et colleys, chiens courants, cockers, rottweilers). Seuls deux groupes, les bergers belges et les retrievers, ne sont pas significativement différents l'un de l'autre.

L'influence de différents paramètres liés à l'environnement sur les profils métaboliques a été mise en évidence : l'alimentation et le mode de vie des chiens (vie en appartement, en maison avec jardin, chiens de travail et de sport, chiens de chasse) entraînent des modifications significatives de la composition des urines.

Dans chaque cas, quelques métabolites jouant un rôle prépondérant dans la différenciation des spectres ont été identifiés sur la base de leur déplacement chimique en spectroscopie RMN.

Discussion

Critères d'inclusion : restriction aux chiens mâles entiers

Seuls des chiens mâles entiers ont été retenus pour cette étude. La raison principale est une plus grande facilité de réalisation des prélèvements d'urines car les mictions sont plus fréquentes chez le mâle et il est possible de fixer une poche sur le pénis, permettant de recueillir la totalité de la miction.

En effet, les chiens utilisés pour l'étude étant des animaux de compagnie appartenant à des particuliers, il était nécessaire de disposer d'une technique de prélèvement la moins invasive possible pour des raisons de faisabilité et d'éthique.

De plus, une étude incluant des femelles suppose la prise en compte des variations engendrés par les modifications hormonales au cours du cycle œstral. En effet, des études métabonomiques conduites chez le rat ont montré une évolution de la composition urinaire au cours du cycle (Bollard *et al.*, 2001). La détermination du stade du cycle aurait pu être réalisée par frottis vaginal chez la chienne mais aurait nécessité de travailler au sein d'une clinique vétérinaire, ce qui aurait généré un stress supplémentaire.

Il serait néanmoins intéressant d'étudier les différences biologiques entre mâles et femelles.

Des modifications liées au sexe ont en effet été mises en évidence chez les espèces de laboratoire avec notamment une augmentation du métabolisme hépatique chez la femelle (Stanley *et al.*, 2005).

Chez l'homme, les sources de variations interindividuelles des profils métaboliques telles que l'influence du mode de vie et de l'alimentation prédominent sur le facteur sexe (Lenz *et al.*, 2004). Chez le chien, notre étude a permis de mettre en évidence l'effet de facteurs intrinsèques (l'âge et la race) malgré les différences d'environnement. Il est donc probable que l'on puisse, de la même manière, mettre en évidence un effet du sexe dans cette espèce, contrairement à l'homme.

L'influence de la castration chez le mâle ou la femelle, qui s'accompagne de variations hormonales et de déviations métaboliques (stockage des graisses), mériterait également d'être explorée.

Etat corporel des chiens de l'échantillon

Proportion de chiens obèses

L'échantillon de chiens utilisés pour l'étude comporte 20% de chiens avec un embonpoint excessif (8,4% de chiens obèses et 11,6% de chiens en surpoids). Cette proportion est inférieure à la prévalence annoncée dans les études les plus récentes, menées aux Etats-Unis (annexe 5).

Néanmoins, la sous-population étudiée (chiens mâles entiers) est moins exposée à l'obésité (Edney *et al.*, 1986) (annexe 5).

De plus, l'étude n'inclut que des chiens sains sur le plan clinique. Certains chiens obèses rencontrés lors de la réalisation des prélèvements ont été écartés en raison de maladies endocriniennes associées (hypercorticisme, diabète sucré) ou de traitement (corticothérapie pouvant être à l'origine de la prise de poids, traitements antalgiques sur les sujets obèses souffrant d'arthrose). L'obésité constitue en effet un facteur de risque pour ces pathologies (Armstrong *et al.*, 2004 ; Edney *et al.*, 1986).

Sur le plan racial, les retrievers sont prédisposés à l'obésité avec un BCS moyen de 6,06, supérieur à celui des autres races. Armstrong *et al.* (2004) ont rapporté des observations analogues.

Proportion de chiens maigres

Par contre, 38% des chiens sont maigres dont un tiers cachectiques, ce qui est bien supérieur aux données publiées (annexe 5).

Cette forte proportion de chiens présentant un état corporel insuffisant peut s'expliquer par la méthode de réalisation des prélèvements : les prélèvements n'ont pas, pour la plupart, été réalisés sur des chiens présentés dans des cliniques vétérinaires, mais directement chez leurs propriétaires. Des chasseurs possédant des meutes de chiens courants utilisés pour la chasse au sanglier ont ainsi été sollicités. Ces chiens, soumis à une activité intense, reçoivent souvent une alimentation inadaptée (30% sont nourris avec des restes, soit 50% du total des chiens nourris avec des restes).

Cette sous-population canine, peu médicalisée, n'est pas prise en compte dans les études épidémiologiques menées sur les animaux présentés en consultation. Elle représente pourtant une part importante du cheptel canin en milieu rural.

Influence des facteurs externes

De nombreux facteurs de variations, liés aux modes de vie et à l'environnement des animaux, ont été difficiles à maîtriser.

Ainsi, le régime alimentaire était assez diversifié et sa composition parfois difficile à connaître. Pour s'affranchir de cet effet, le prélèvement de chiens à jeun avait été suggéré. Néanmoins, la réalisation devenait délicate, les chiens n'étant pas nourris aux mêmes horaires et recevant un nombre de repas différents (un à trois repas par jour, voire alimentation *ad libitum*).

Seuls le délai depuis le dernier repas a été relevé. Ce délai a varié de une à vingt-et-une heures, quels que soient le mode de vie du chien et son alimentation. Cependant, parmi les plus jeunes chiens, aucun n'est à jeun, ce qui aurait pu constituer un biais. Néanmoins, la représentation en ACP montre que la projection des individus est davantage affectée par l'âge que par le délai depuis le dernier repas (Figure 11).

Concernant l'activité, la séparation des chiens en quatre catégories (chiens de compagnie vivant en appartement, chiens en maison avec jardin, chiens de sport et de travail, chiens de chasse) se superpose avec la catégorie socioprofessionnelle des propriétaires. Ainsi, les chiens d'appartement appartiennent à des étudiants vétérinaires vivant dans le même environnement, à savoir la cité des élèves de l'ENVT. Les chiens de sport sont majoritairement entraînés en agility (70%), ils appartiennent à une population aisée, investissant beaucoup dans l'entretien de ses chiens. A l'inverse, les chiens de chasse, qui sont tous dans cette étude des chiens de meute, sont très peu médicalisés. Cela se traduit notamment par des disparités au niveau de la qualité de l'alimentation distribuée et peut être une source de biais.

Il serait intéressant de compléter les résultats obtenus concernant l'influence de l'activité en relevant davantage de paramètres. Ainsi, l'effet de la réalisation d'un exercice avant le prélèvement serait à étudier, en prenant en compte la durée et l'intensité de l'exercice ainsi que délai entre l'exercice et le prélèvement. En effet, le dosage de différents paramètres plasmatiques, tels que la créatininémie, la glycémie ou les concentrations en enzymes musculaires, ont montré des variations selon :

(i) le niveau d'entraînement des chiens : chez des beagles non entraînés, l'exercice n'entraîne pas de modifications des paramètres plasmatiques (Chanoit *et al.*, 2002) alors que des variations ont été mises en évidence chez les chiens de traîneaux (Hinchcliff *et al.*, 1993) et chez les Greyhounds (Ilkiw *et al.*, 1989),

(ii) le type d'effort : les paramètres plasmatiques, mesurés avant et après une course d'endurance, ne sont que modérément modifiés chez des chiens de traîneaux (Hinchcliff *et al.*, 1993) alors que des variations plus importantes sont engendrées par un sprint chez des Greyhounds (Ilkiw *et al.*, 1989),

(iii) le délai après l'exercice : les paramètres biochimiques perturbés après 400 m de sprint chez des Greyhounds retrouvent des valeurs basales en 20 à 30 minutes (Rose *et al.*, 1989).

La métabonomique permettrait certainement de compléter ces observations.

Méthode de collecte

Les prélèvements d'urine ont été réalisés par miction spontanée. La présence de particules contaminantes n'était pas problématique, les échantillons étant ensuite centrifugés. Cette méthode présentait l'avantage d'être réalisable en toute situation de terrain et de ne pas être stressante pour les chiens. La pose de la poche à prélèvement a été bien tolérée, y compris par les chiens de chenils, moins habitués aux manipulations.

La totalité de la miction a été recueillie de façon à éviter des biais liés à des variations de concentrations en métabolites en fonction de la fraction de la miction.

Cependant, un seul prélèvement a été réalisé pour chaque chien. L'existence de variations nyctémérales ayant été montrée chez le rat (Bollard *et al.*, 2001), l'idéal serait de prélever la totalité des urines journalières comme cela est possible chez l'homme (Lenz *et al.*, 2003).

Les prélèvements ont été congelés dans un délai maximal d'une heure. Néanmoins, une perte en composés volatils est possible.

Analyses spectroscopiques et statistiques

Les analyses ont été réalisées en RMN à une dimension seulement. L'utilisation de la RMN 2D aurait pu être intéressante pour affiner la distribution des pics et l'interprétation en terme de composés impliqués.

Pour les analyses statistiques, certaines limites liées au nombre de chiens sont apparues. En effet, l'étude de l'effet de la race, qui ne constituait pas un de nos axes de recherche au départ, a

nécessité le regroupement de certains chiens (chiens courants, border collies et colleys...). Malgré cela, les effectifs sont d'assez petites tailles (6 individus pour certaines races). Il serait intéressant de travailler sur des groupes raciaux de taille supérieure, avec des animaux d'âges différents, afin d'avoir la possibilité de croiser les effets « race » et « âge » et d'évaluer l'importance relative de ces deux effets, qui paraissent prépondérants dans l'explication des variations du métabolisme chez le chien d'après cette première étude.

Interprétation des résultats des AFD

Effet de l'âge

L'étude de la composition urinaire en fonction de l'âge fait apparaître des variations dans l'excrétion des intermédiaires du cycle de Krebs. Ainsi, le 2-hydroxyglutarate est présent en plus grande quantité chez le chiot que chez l'adulte tandis que, chez le chien adulte, l'excrétion de malate et d'oxaloacétate diminue avec l'âge alors que l'excrétion de citrate augmente.

Une diminution de l'excrétion d'oxaloacétate a aussi été observée chez le rat vieillissant (Bollard *et al.*, 2005). Par contre, l'excrétion en citrate diminue avec l'âge chez le rat (Bollard *et al.*, 2005) alors qu'elle augmente chez les chiens de notre expérience. Cette augmentation de l'excrétion en citrate avec l'âge se retrouve chez l'homme (Hosking *et al.*, 1985).

Chez le rat, ces variations d'excrétion des intermédiaires du cycle de Krebs ont été mises en rapport avec les variations de la balance acido-basique liées au déclin de la fonction rénale avec l'âge (Bollard *et al.*, 2005).

Le métabolisme énergétique montre également d'autres modifications entre le chiot et l'adulte, avec notamment des concentrations en pyruvate et dihydroxyacétone plus importantes chez les chiots. Cette différence pourrait traduire une induction de la glycolyse et du métabolisme anaérobie chez les chiots ou une entrée réduite du pyruvate dans leur cycle de Krebs (au profit de certains acides aminés glucoformateurs).

Par ailleurs, la rétention azotée est supérieure chez le chiot. Ainsi, l'excrétion en 2-oxoisovalérate (ou α -cétoisovalérate), précurseur de l'acétylCoA formé par transamination à partir de la valine dans le foie et les muscles, est augmentée chez l'adulte. Un composé incomplètement identifié, mais qui pourrait être la β -alanine ou la citrulline, est également excrété en plus grande quantité chez l'adulte.

La β -alanine joue le rôle de transporteur de l'azote lors du catabolisme des acides aminés musculaires et constitue un précurseur de l'acétylCoA. La citrulline est un intermédiaire du cycle de l'urée. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer l'augmentation de leur excrétion :

(i) soit les voies d'utilisation de ces composés sont plus actives chez le chiot. Ceci pourrait résulter d'une entrée supérieure d'acides aminés glucoformateurs dans le cycle de Krebs en relation avec l'importance des besoins énergétiques chez le jeune (annexe 6), ou d'un *turn over* plus important des acides aminés pour l'accrétion protéique liée à la croissance.

(ii) soit la production de ces composés est moindre chez le chiot du fait des masses musculaires plus faibles.

D'autres variations du catabolisme des acides aminés ont aussi été mises en évidence avec l'âge : chez l'adulte, l'excrétion de phénylalanine (ou de phénylacétylglycine, la distinction n'est pas possible d'après les spectres en RMN 1D) et d'isoleucine (ou de valine) diminue avec l'âge.

De plus, l'excrétion en créatine et créatinine est inférieure chez le chiot par rapport à l'adulte. Cependant, la première source de créatine est exogène (alimentation carnée) même si de la créatine endogène est synthétisée dans le rein (annexe 6). Or, les chiots sont tous nourris avec des croquettes tandis que les adultes sont parfois nourris avec des carcasses de canard (6 chiens) ou des restes de viande (15 chiens). Aussi, l'alimentation apporte un biais qui gêne l'interprétation.

Par contre, en ce qui concerne la créatinine, synthétisée dans le muscle par un processus spontané, irréversible et non enzymatique, l'alimentation est une source mineure (formation lors de la cuisson de la viande). L'augmentation de l'excrétion de créatinine a été montrée chez le chiot entre 2 semaines et 6 mois (Wolford *et al.*, 1988). Cela a été mis en relation avec l'augmentation de l'exportation de créatinine musculaire - corrélée à l'augmentation de la masse musculaire - et avec l'augmentation du débit de filtration glomérulaire lié à l'acquisition de la maturité du rein (Watson *et al.*, 2003).

La différence entre les urines de chiots et de chiens adultes dépend également de composés liés à des variations du régime alimentaire et de la composition de la microflore intestinale. Ainsi, on retrouve chez le chiot davantage de 3-HPPA, de 4-HPPA (acide hydroxyphénylpropionique) et d'un composé qui pourrait être de la diméthylglycine.

L'acide hydroxyphénylpropionique est synthétisé par la microflore intestinale à partir des acides aminés aromatiques d'origine végétale. Selon le régime alimentaire, la microflore synthétise de l'HPPA ou de l'acide benzoïque (ensuite conjugué par la glycine en hippurate au niveau hépatique). L'excrétion d'hippurate ou de HPPA ne dépendrait pas de l'âge mais du régime alimentaire chez le rat (Phipps *et al.*, 1998). De même, la diméthylglycine provient de la dégradation de la choline d'origine alimentaire (annexe 6). Chez les jeunes rats, est décrite une

augmentation de la bêtaïne et de la TMAO (triméthylamine-N-oxyde), deux composés qui proviennent également du catabolisme de la choline. Ceci a été relié à un excès de choline dans l'alimentation du jeune (Bollard *et al.*, 2005). Dans notre étude, un biais est également inévitable entre les paramètres « âge » et « alimentation », les chiots recevant une alimentation industrielle pour chiens en croissance, différente de l'alimentation des adultes.

BCS

Cette étude n'a pas permis de mettre en évidence une influence de l'état corporel sur le profil métabolique urinaire. Néanmoins, cette conclusion doit être modulée en prenant en considération la faible proportion de chiens obèses dans l'échantillon (8,4%) et le grand nombre de facteurs influençant par ailleurs le profil métabolique. Aussi, préfèrera-t-on dire que cet effet, s'il existe, est mineur par rapport à l'influence de l'âge, de la race, de l'alimentation et de l'activité.

Races

Distances entre les races

La race semble être déterminante sur la variation du métabolisme chez le chien. Malgré de faibles effectifs, un certain nombre de groupes raciaux ont été séparés. Ainsi, les bergers allemands et les rottweilers qui appartiennent à des races anciennes, ayant reçu peu d'apports d'autres races dans leur histoire, sont très différents des autres. Il en est de même pour les cockers et les beaucerons.

Concernant les « chiens courants », plusieurs races différentes ont été regroupées sous ce terme tandis qu'une similitude de mode de vie renforce l'unité de ce groupe. Une superposition des effets « races » et « activité » intervient probablement : la variable V128, correspondant au déplacement chimique $\delta = 2,94$ ppm (diméthylglycine ou créatinine), est la plus importante pour séparer les chiens courants des autres races lors de l'AFD portant sur les races et pour séparer les chiens de chasse lors de l'AFD portant sur les activités.

Par ailleurs, les border collies et les colleys sont significativement différents des autres races mais les distances sont moins grandes : probabilités de Mahalanobis $p = 0,0387$ pour la distance (border collies et colleys - retrievers) et $p = 0,0296$ pour la distance (border collies et colleys - cockers). Deux hypothèses peuvent être avancées : soit le regroupement des races induit une variabilité au sein de ce groupe qui gêne son individualisation, soit ce résultat provient de la genèse de la race border collie qui a fait intervenir de nombreux croisements avec d'autres races (comme le bearded collie, le colley, puis le pointer et le setter gordon).

Les bergers belges et les retrievers ne sont pas séparés. Pourtant, *a priori*, ces deux races n'ont pas de parenté génétique. Aucune explication ne peut être apportée quant à cette observation.

Composés impliqués

La séparation entre les races de chiens fait intervenir des modifications du métabolisme des acides aminés, avec notamment :

- (i) une augmentation de l'excrétion en valine chez les rottweilers et une diminution de l'excrétion de ce composé chez les chiens courants et les bergers allemands,
- (ii) une diminution de l'excrétion en 2-oxoisocaproate (catabolite de la leucine) chez le berger allemand,
- (iii) une diminution de l'excrétion en thréonine chez les chiens courants et les bergers allemands,
- (iv) une augmentation de l'excrétion de méthylmalonate (catabolite de la valine) chez les chiens courants et les rottweilers et, à l'inverse, une diminution chez les bergers allemands.

L'excrétion de créatinine est également variable selon la race avec en particulier une excrétion faible chez le rottweiler et plus élevée chez le berger allemand. Braun *et al.* (2003) ont aussi mentionné une possible influence de la race sur la concentration plasmatique en créatinine.

Enfin, des variations au niveau de l'excrétion des métabolites du cycle de Krebs ont été notées avec en particulier une augmentation de l'excrétion de citrate et de malate chez le rottweiler.

Alimentation

Chez les chiens nourris avec des carcasses de canard crues, l'excrétion en créatine, créatinine, taurine et citrulline est augmentée, ce qui est mis en relation avec l'alimentation carnée. On soulignera également l'excrétion accrue de taurine, détruite par la cuisson mais présente en grande quantité dans la viande crue. Cependant, les chiens nourris avec des carcasses de canards étant tous des chiens courants utilisés pour la chasse, il existe un facteur de confusion entre l'alimentation, la race et l'activité concernant ces résultats.

L'excrétion accrue de tyrosine chez les chiens recevant des croquettes Purina Proplan® pourrait résulter de différences de teneur en tyrosine des sources de protéine utilisées. Les croquettes Proplan® consommées par les chiens de cette étude sont majoritairement à base de

saumon, dont la teneur en tyrosine est peut-être supérieure à celle des matières premières utilisées par les autres fabricants d'aliments industriels.

Mode de vie

On note chez les chiens de chasse une augmentation de la concentration urinaire en créatine et créatinine et une diminution en glycine (précurseur de ces molécules) pouvant traduire une induction du métabolisme au niveau musculaire, avec notamment une augmentation de la synthèse de créatinine. L'excrétion de citrulline est aussi augmentée, ce qui irait aussi dans le sens d'une augmentation du catabolisme protéique.

Chez les chiens de sport, on remarque également une augmentation de la créatininurie. Parallèlement, au niveau plasmatique, la créatinémie serait également supérieure chez des chiens possédant une musculature développée tels que les Greyhounds (Braun *et al.*, 2003) et une hypercréatininémie est rapportée pendant les 60 minutes suivant la réalisation d'un effort de type explosif (Rose *et al.*, 1989).

Par ailleurs, la variable V128, correspondant au déplacement chimique $\delta = 2,94$ ppm, est particulièrement importante pour la séparation des chiens de chasse (corrélation canonique avec l'axe 1 = 1,00). Elle peut correspondre à la résonance de la créatinine ou de la diméthylglycine.

L'augmentation de la créatininurie a été envisagée ci-dessus.

Quant à la diméthylglycine, elle provient du catabolisme de la choline, molécule servant à la synthèse des phospholipides membranaires et du neurotransmetteur acétylcholine (annexe 6). La principale source de choline est l'alimentation. Elle est notamment présente en grande quantité dans le lait, les œufs, le foie, les noix... mais elle peut également provenir de la dégradation des phospholipides membranaires dont elle constitue le précurseur. Or les chiens de chasse utilisés dans notre étude possédaient en général un mauvais état corporel (BCS moyen 2,41) et étaient soumis à des efforts intenses, la période de chasse étant en cours lors des prélèvements. Aussi, l'existence de lésions tissulaires, notamment musculaires, entraînant une augmentation des dégradations membranaires et de la production de choline, serait possible.

Par ailleurs, la concentration en lactate est augmentée chez les chiens de sport alors qu'elle est diminuée chez les chiens courants. Cette observation pourrait être liée au type d'exercice fourni par chacune des deux catégories de chiens. Chez les chiens de chasse, l'adaptation à un effort de longue durée pourrait avoir favorisé les voies aérobies. Les chiens de chasse recrutés dans cette étude sont

en effet employés pour la traque du sanglier, ce qui impose une course prolongée, alors que les chiens de ring ou d'agility fournissent des efforts intenses et de courte durée, donc anaérobie.

Cette première étude métabonomique réalisée dans l'espèce canine s'intéresse, dans un but purement pratique, à une sous population particulière, celle des chiens mâles non castrés.

Malgré le grand polymorphisme de l'échantillonnage étudié, tant sur le plan racial qu'environnemental, l'âge et la race, deux facteurs intrinsèques, influençant de façon significative les profils métaboliques, ont été révélés.

L'âge engendre des variations dans l'excrétion des intermédiaires du métabolisme du cycle de Krebs, ainsi qu'une augmentation de l'excrétion des molécules issues du métabolisme azoté et de la créatinine chez l'adulte. Néanmoins, l'évolution des microflores intestinales, liée notamment aux différences de régime alimentaire, est également responsable de la variation des profils métaboliques entre les chiots et les adultes.

Les différences entre races se traduisent par des variations de l'excrétion des catabolites des acides aminés, de la créatinine et des intermédiaires du cycle de Krebs.

L'alimentation et le mode de vie modifient également la composition des urines, avec notamment l'apparition de métabolites provenant de l'ingestion de matières premières différentes...

L'effet du sexe mériterait maintenant d'être étudié.

Certaines races ont été isolées plus facilement que d'autres dans cette étude. Les groupes raciaux utilisés étaient cependant de petite taille et l'étude des modifications métaboliques liées à la race mériterait d'être approfondie sur de plus grands effectifs.

Enfin, il semble que le mode de vie modifie l'excrétion de certains composés. Il serait intéressant de compléter ces observations en utilisant davantage de critères objectifs pour l'évaluation de l'activité (durée de l'effort, délai depuis l'effort...), au sein d'individus de même sexe, de même âge, de même race et alimentés de la même manière.

Conclusion

Les signatures biologiques constituent une démarche novatrice pour étudier les réponses métaboliques des systèmes biologiques à différents stimuli. L'application de techniques telles que la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire permet une description exhaustive des métabolites présents dans les liquides biologiques, les tissus ou les cellules. Les contrastes biologiques sont ensuite révélés par des analyses statistiques multivariées à partir des grands jeux de données ainsi générés.

Dans cette étude, les signatures biologiques ont été réalisées à partir de l'analyse par spectroscopie RMN ^1H des urines de 95 chiens mâles entiers en bonne santé. Ce travail permet de mettre en évidence un effet de l'âge mais non de l'état corporel des animaux sur le métabolisme général. Par ailleurs, d'autres paramètres, intrinsèque (race) et extrinsèques (alimentation, activité) influencent de façon significative les profils métaboliques obtenus.

Ces premiers résultats obtenus chez le chien se rapprochent de ceux mis en évidence chez les espèces de laboratoire chez qui l'influence de ce type de facteurs (sexe, souche, alimentation, nature de la microflore intestinale...) a fait l'objet de plusieurs publications. Chez l'homme, les variations interindividuelles du métabolisme sont importantes du fait de la diversité de mode de vie. Cela gêne l'interprétation des résultats métabonomiques et constitue un obstacle pour la transposition des études cliniques. Le chien est l'animal de compagnie dont le mode de vie suit le plus celui de l'homme. Les mêmes difficultés sont donc prévisibles, d'autant plus qu'on note en sus une diversité raciale, entretenue par sélection, dans cette espèce. Les résultats obtenus ici apportent quelques éléments de réponse sur les sources principales de variation du métabolisme chez le chien.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

Mlle MARROU Béatrice, Julie

a été admis(e) sur concours en : 2000

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 31/03/05

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

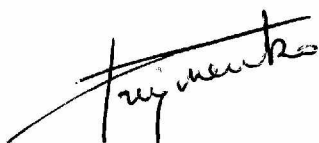
Je soussignée, N. PRIYMENKO, Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, autorise la soutenance de la thèse de :

Mlle MARROU Béatrice, Julie

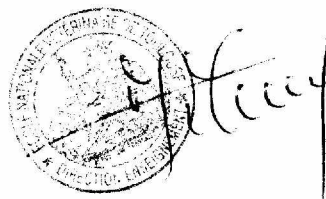
intitulée :

Répercussions métaboliques de l'âge et de l'état corporel chez le chien. Etude expérimentale par la technique des « signatures biologiques »

**Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Docteur Nathalie PRIYMENKO**



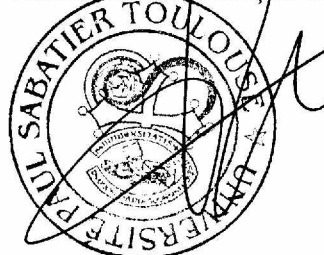
**Vu :
Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON**



**Vu :
Le Président de la thèse :
Professeur Jean-Pierre LOUVET**



**Vu le : 15 NOV. 2005
Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Jean-François SAUTEREAU**



Bibliographie

ARMSTRONG P. J., LUND E.M., KIRK C.A., KLAUSNER J.S.

Prevalence and risk factors for obesity in dogs and cats.

22nd Annual ACVIM Proceedings, Minneapolis, 2004, p 6.

BOLLARD M.E., KEUN H. C., BECKONERT O., EBBELS T. M. D., ANTTI H., NICHOLLS A. W., SHOCKOR J. P., CANTOR G. H., STEVENS G., LINDON J. C., HOLMES E., NICHOLSON J. K.

Comparative metabonomics of differential hydrazine toxicity in the rat and mouse.

Toxicol. Appl. Pharmac., 2005, **204**, 135-151.

BOLLARD M.E., HOLMES E., LINDON J.C., MITCHELL S.C., BRANSTETTER D., ZHANG W., NICHOLSON J.K.

Investigations into biochemical changes due to diurnal variation and estrus cycle in female rats using high resolution ¹H-NMR spectroscopy of urine and pattern recognition.

Anal. Biochem., 2001, **295**, 194-202.

BOLLARD M.E., STANLEY E.G., LINDON J.C., NICHOLSON J.K., HOLMES E.

NMR-based metabonomic approaches for evaluating physiological influences on biofluid composition.

NMR Biomed., 2005, **18**,143-162.

BRAUN J.P., LEFEBVRE H.P., WATSON A.D.

Creatinine in the dog : a review.

Vet. Clin. Pathol., 2003, **32**, 162-179.

BRINDLE J.T., ANTTI H., HOLMES E., TER G., NICHOLSON J.K., BETHELL H.W.L., CLARKE S., SCHOFIELD P.M., McKILLIGIN E., MOSEDALE D.E., GRAINGER D.J.

Rapid and non-invasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ¹H-NMR-based metabonomics.

Nat. Med., 2002, **8**, 1439-1444.

CANET D., BOUBEL J-Cl., CANET-SOULAS E.

La RMN : concept, méthodes et applications.

Dunod, Paris, 2002, Chap 1 : structure des spectres de résonance magnétique nucléaire, 2-47.

CHANOIT G.P., CONCORDET D., LEFEBVRE H.P., ORCEL K., BRAUN J.P.

Exercise does not induce major changes in plasma muscle enzymes, creatinine, glucose and total proteins concentrations in untrained beagle dogs.

J. Vet. Med. A, 2002, **49**, 222-224.

DUMAS M.E.

Les signatures biologiques : étude globale des perturbations de l'homéostasie métabolique par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire, spectrométrie de masse et par reconnaissance de forme. Application au cas des stéroïdes anabolisants en élevage.

Thèse de doctorat de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes, 2002, 230 pages.

EBBELS T.M.D., HOLMES E., LINDON J.C., NICHOLSON J.K.

Evaluation of metabolic variation in normal rat strains from a statistical analysis of ¹H-NMR spectra of urine.

J. Pharm. Biomed. Anal., 2001, **26**, 823-833.

EDNEY A.T.B., SMITH P.M.

Study of obesity in dogs visiting veterinary practices in the UK.

Vet. Rec., 1986, **118**, 391-401.

GAVAGHAN C.L., HOLMES E., LENZ E., WILSON I.D., NICHOLSON J.K.

An NMR-based metabonomic approach to investigate the biochemical consequences of genetic strain difference: application to the C57BL10j and Alpk:ApfCD mouse.

FEBS Lett., 2000, **484**, 169-174.

GAVAGHAN C.L., NICHOLSON J.K., CONNOR S.C., WILSON I.D., WRIGHT B., HOLMES E.

Directly coupled high-performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance spectroscopic with chemometric studies on metabolic variation in Sprague-Dawley rats.

Anal. Biochem., 2001, **291**, 245-252.

HENRY P.G., LEBON V., VAUFREY F., BROUILLET E., HANTRAYE P., BLOCH G.
Decreased TCA cycle rate in the rat brain after acute 3-NP treatment measured by in vivo ^1H - ^{13}C NMR spectroscopy.

J. Neurochem., 2002, **82**, 857-866.

HINCHCLIFF K.W., OLSON J., CRUSBERG C., KENYON J., LONG R., ROYLE W., WEBER W., BURR J.

Serum biochemical changes in dogs competing in a long-distance sled race.

JAVMA, 1993, 202, 401-405.

HOLM P.I., UELAND P.M., KVALEIM G., LIEN E.A.

Determination of choline, betaine and dimethylglycine in plasma by a high throughput method based on normal-phase-chromatography-tandem mass spectrometry.

Clin. Chem., 2003, **49**, 286-294.

HOLMES E., FOXALL P. J.D., SPRAUL M., FARRANT D., NIKOLSON J.K., LINDON J.C.

750 MHz ^1H -NMR spectroscopy characterisation of the complex metabolic pattern of urine from patients with inborn errors of metabolism: 2-hydroxyglutaric aciduria and maple syrup urine disease.

J. Pharm. Biomed. Anal., 1997, **15**, 1647-1659.

HOSKING D.H., WILSON J.W., LIEDTKE R.R., SMITH L.H., WILSON D.M.

Urinary citrate excretion in normal persons and patients with idiopathic calcium urolithiasis.

J. Lab. Clin. Med., 1985, **106**, 682-689.

HOWELLS S.L., MAXWELL R.J., HOXE F.A., PEET A.C., STUBBS M., RODRIGUES L.M., ROBINSON S.P., BALUCH S., GRIFFITHS J.R.

Pattern recognition of ^{31}P magnetic resonance spectroscopy tumour spectra obtained in vivo.

NMR Biomed., 1993, **6**, 237-241.

HOWELLS S.L., MAXWELL R.J., PEET A.C., GRIFFITHS J.R.

An investigation of tumor ^1H nuclear magnetic resonance spectra by the application of chemometric techniques.

Magn. Reson. Med., 1992, **28**, 214-236.

ILKIW J.E., DAVIS P.E., CHURCH D.B.

Hematologic, biochemical, blood-gas, and acid-base values in greyhounds before and after exercise.
Am. J. Vet. Res., 1989, **50**, 583-586.

KEALY R.D., LAWLER D.F., BALLAM J.M., MANTZ S., BIERY D.N., GREELEY E.H., LUST G., SEGRE M., SMITH G.K., STOWE H.D.

Effect of diet restriction on life-span and age-related changes in dogs.
JAVMA, 2002, **220**, 1315-1320.

KEUN H.C., EBBELS T.M.D., ANTTI H., BOLLARD M.E., BECKONERT O., SCLOTTERBECK G., SENN H., NIEDERHAUSER U., HOLMES E., LINDON J.C., NICHOLSON J.K.

Analytical reproducibility in ¹H-NMR-based metabonomics urinalysis.
Chem. Res. Toxicol., 2002, **15**, 1380-1386.

LAFLAMME D.P.

Development and validation of a Body Condition Score System for Dogs.
Can. Pract., 1997, **22**, 10-15.

LAFLAMME D.P., KEALY R.D., SCHMIDT D.A.

Estimation of body fat by BCS.
J. Vet. Int. Med., 1994, **8**, 154A.

LAWLER D.F., EVANS R.H., LARSON B.T., SPITZNAGEL E.L., ELLERSIEK M.R., KEALY R.D.

Influence of lifetime food restriction on causes, time and predictors of death in dogs.
JAVMA, 2005, **226**, 225-231.

LEBON V., PETERSEN K.F., CLINE G.W., SHEN J., MASON G.F., DUFOUR S., BEHAR K.L., SHULMAN G.I., ROTHMAN D.L.

Astroglial contribution to brain energy metabolism in humans revealed by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy: elucidation of the dominant pathway for neurotransmitter glutamate repletion and measurement of astrocytic oxidative metabolism.
J. Neurosci., 2002, **22**, 1523-1531.

LEFEBVRE H.P., WATSON A.D.T., TOUTAIN P.L., BRAUN J.P.

Absence de validation technique et biologique de la créatininémie du chien et difficultés de l'interprétation.

Rev. Med. Vet., 1998, **149**, 7-14.

LENZ E.M., BRIGHT J., WILSON I.D., MORGAN S.R., NASH A. F. P.

A ¹H NMR-based metabonomic study of urine and plasma samples obtained from healthy human subjects.

J. Pharm. Biomed. Anal., 2003, **33**, 1103-1115.

LENZ E.M., BRIGHT J., WILSON I.D., HUGHES A., MORISSON J., LINDBERG H., LOCKTON A.

Metabonomics, dietary influences and cultural differences: a NMR-based study of urine samples obtained from healthy British and Swedish subject.

J. Pharm. Biomed. Anal., 2004, **36**, 841-849.

LEO G.C., CALDWELL G.W., CROOKE J., MALATYNSKA E., COTTO C., HASTINGS B., SCOWCROFT J., HALL J., BROWNE K., HAGENAM W.

The application of nuclear magnetic resonance-based metabonomics to the dominant-submissive rat behavioural model.

Anal. Biochem., 2005, **339**, 174-178.

LINDON J.C., HOLMES E., NICHOLSON J.K.

Pattern recognition methods and applications in biochemical magnetic resonance.

Progr. Nucl. Magn. Res. Spectrosc., 2001, **39**, 1-40.

LINDON J.C., HOLMES E., NICHOLSON J.K.

So what's the deal with "Metabonomics"?

Anal. Chem., 2003, **1**, 385-391.

LINDON J.C., HOLMES E., NICHOLSON J.K.

Toxicological applications of magnetic resonance.

Progr. Nucl. Magn. Res. Spectrosc., 2004, **45**, 109-143.

LINDON J.C., NICHOLSON J.K., HOLMES E., ANTTI H., BOLLARD M.E., KEUN H., BECKONERT O., EBBELS T. M., REILY M.D., ROBERTSON D., STEVENS G.J., LUKE P., BREAU A. P., CANTOR G. H., BIBLE R. H., NIEDERHAUSER U., SENN H., SCHLOTTERBECK G., SIDELMANN, LAURSEN S.M., TYMIK A., CAR B.D., LEHMAN-McKEEMAN L., COLET J-M., LOUKACI A., THOMAS C.

Contemporary issues in toxicology. The role of metabonomics in toxicology and its evaluation by the COMET project.

Toxicol. Appl. Pharmac., 2003, **187**, 137-146.

LUND E.M., ARMSTRONG P.J., KIRK C.A., KOLAR L.M., KLAUSNER J.S.

Health status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States.

JAVMA, 1999, **214**, 1336-1345.

MORVAN D., JEHENSON P., DUBOC D., SYROTA A.

Discriminant factor analysis of ³¹P-NMR spectroscopic data in myopathies.

Magn. Reson. Med., 1990, **13**, 216-227.

MOUSSARD C.

La biochimie : Biochimie structurale et métabolique.

De Boeck, Paris, 1999.

NICHOLLS A.W., MORTISHIRE-SMITH R.J., NICHOLSON J.K.

NMR-spectroscopic-based metabonomic studies of urinary metabolite variation in acclimatizing germ-free rats.

Chem. Res. Toxicol., 2003, **16**, 1395-1404.

NICHOLSON J.K., CONELLY J., LINDON J.C., HOLMES E.

Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function.

Nat. Rev. Drug. Discov., 2002, **1**, 153-162.

NICHOLSON J.K., LINDON J.C., HOLMES E.

“Metabonomics”: understanding the metabolic response of living systems to pathological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data.

Xenobiotica, 1999, **29**, 1181-1189.

PHIPPS A.N., STEWART J., WRIGHT B., WILSON I.D.

Effect of diet on the urinary excretion of hippuric acid and other dietary-derived aromatics in rat. A complex interaction between diet, gut microflora and substrate specificity.

Xenobiotica, 1998, **28**, 527-537.

ROSE R.J., BLOOMBERG M.S.

Responses to sprint exercise in the greyhound: effects on haematology, serum biochemistry and muscle metabolites.

Res. Vet. Sci., 1989, **47**, 212-218.

STANLEY E.G., BAILEY N.J.C., BOLLARD M.E., HASELDEN J.N., WATERFIELD C.J., HOLMES E. NICHOLSON J.K.

Sexual dimorphism in urinary metabolite profile of Han Wistar rats revealed by nuclear-magnetic-resonance-based metabonomics.

Anal. Biochem., 2005, in press, disponible en ligne sur www.sciencedirect.com.

TANG H., WANG Y., NICHOLSON J.K., LINDON J.L.

Use of relaxation-edited one-dimensional and two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy to improve detection of small metabolites in blood plasma.

Anal. Biochem., 2004, **325**, 260-272.

WANG Y., HOLMES E., NICHOLSON J.K., CLOAREC O., CHOLLET J., TANNER M., SINGER B.H., UTZINGER J.

Metabonomic investigations in mice infected with *Schistosoma mansoni*: an approach for biomarker identification.

PNAS, 2004, **101**, 12676-12681.

WATSON A.D.J., LEFEBVRE H.P.

Assessment of renal function using creatinine: new insights into an old question.

21st Annual ACVIM Proceedings, 2003, Charlotte (North Carolina), p 688-690.

WILLIAMS R.E., LENZ E.M., EVANS J.A., WILON I.D., GRANGER J.H., PLUMB R.S., STUMPF C.L.

A combined ¹H-NMR and HPLC-MS-based metabonomic study of urine from obese (fa/fa) Zucker and normal Wistar-derived rats.

J. Pharm. Biomed. Anal., 2005, **38**, 465-471.

WOLFORD S.T., SHOER R.A., GOHO F.X., GALLO P.P., FALK H.B., DENTE A.R.

Effect of age on serum chemistry profile, electrophoresis and thyroid hormones in beagle dogs two weeks to one year of age.

Vet. Clin. Pathol., 1988, **17**, 35-42.

Annexes

Annexe 1 : “Body Condition Score” System (Laflamme, 1997)

TROP MAIGRE	1	Côtes, vertèbres lombaires, os du bassin et toutes les saillies osseuses bien visibles de loin. Absence de graisse corporelle décelable. Fonte musculaire manifeste.	
	2	Côtes, vertèbres lombaires, os du bassin facilement visibles. Absence de graisse palpable. Certaines autres saillies osseuses bien visibles. Fonte musculaire minime.	
	3	Côtes facilement palpables et éventuellement visibles sans graisse palpable. Sommets des vertèbres lombaires visibles. Os du bassin tendant à être saillants. Taille et creux abdominal bien marqués.	
IDEAL	4	Côtes facilement palpables, avec une couverture graisseuse minime. Taille bien marquée, vue de dessus. Creux abdominal bien visible.	
	5	Côtes palpables sans couverture graisseuse excessive. Taille perceptible derrière les côtes, vue de dessus. Creux abdominal visible, vu de côté.	
TROP GROS	6	Côtes palpables avec un léger excédent de couverture graisseuse. Taille perceptible vue de dessus, mais pas saillante. Creux abdominal apparent.	
	7	Côtes difficilement palpables, couverture graisseuse épaisse. Dépôt graisseux visibles en région lombaire et à la base de la queue. Taille absente ou difficilement visible. Creux abdominal éventuellement présent.	
	8	Côtes non palpables, sous une épaisse couche de graisse, ou palpables uniquement en appliquant une pression importante. Epais dépôts graisseux en région lombaire et à la base de la queue. Absence de taille. Absence de creux abdominal. Présence éventuelle de distension abdominale.	
	9	Dépôts graisseux importants au niveau du thorax, de la colonne vertébrale et à la base de la queue. Absence de taille et de creux abdominal. Dépôts graisseux au niveau du cou et des membres.	

Annexe 2 : Récapitulatif des prélèvements

Légende

Age en classe

- 1- chiots d'âge inférieur ou égal 10 mois
- 2- jeunes adultes] 10 mois-4ans]
- 3- chiens adultes d'âge mûr] 4ans-7ans]
- 4- chiens âgés

Activité

- 1- chiens vivant en appartement
- 2- chiens vivant en maison avec jardin
- 3- chiens de sport (troupeau, agility, ring)
- 4- chiens de chasse (chiens de meutes, en saison de chasse)

Alimentation

Lorsque la marque n'est pas connue du propriétaire, un point d'interrogation est ajouté :

- en ce qui concerne les croquettes achetées en supermarché, il s'agit en général de propriétaires prenant indifféremment une marque ou l'autre. Dans ce cas, le qualificatif « bas de gamme » est ajouté quand le critère de choix est le prix le plus bas.
- lorsque l'aliment est acheté dans un magasin spécialisé mais que la marque n'est pas connue, le lieu d'achat et le critère de choix ou la gamme sont notés.

n°	Race	BCS	Age (ans)	Age en classes	Poids réel	Poids optimal	Délai depuis dernier repas (h)	Alimentation	Activité
11	Berger Belge Tervueren	1	1,91	2	22	32	16	croquettes "Bio Meal"	3
12	Beauceron	2	1,08	2	28	35	13	croquettes "Carrefour"	1
13	Border Collie	2	2	2	22	25	3,5	croquettes "Agi+"	3
14	Jack Russel	2	1,08	2	7,5	9	2,5	croquettes "RC Mini Adult"	1
15	Ariégeois	1	1,25	2	25	35	7	croquettes 1 ^{er} prix Gamm Vert	4
16	Ariégeois	1	3,58	2	25	35	7	croquettes 1 ^{er} prix Gamm Vert	4
17	Griffon Bleu de Gascogne	1	3	2	20	27	21	pain, riz, pâtes, croquettes bas de gamme (?)	4
18	Grand Bleu de Gascogne	1	3,58	2	22	30	7	carcasses de canard	4
19	Labrador X Beauceron	2	2,16	2	42	50	20	croquettes "Friskies"	2
20	Griffon Bleu de Gascogne	2	3,5	2	20	25	16	croquettes animalerie (?) + complément minéral (?)	4
21	Berger Belge Tervueren	2	5,33	3	23,2	28	6	croquettes "RC Maxi Adult"	1
22	Berger Belge Malinois	1	5,08	3	28	35	13	croquettes "RC Maxi Adult"	3
23	Petit Bleu de Gascogne	1	4,58	3	18	25	20	restes, riz, viande, croquettes	4
24	Griffon Bleu de Gascogne	1	4,08	3	18	25	21	pain, riz, pâtes, croquettes	4
25	X Fox terrier	2	6,42	3	12	15	20	croquettes 1 ^{er} prix Pôle Vert	4
26	Ariégeois	1	4,91	3	35	45	20	croquettes 1 ^{er} prix Pôle Vert	4
27	Border Collie	2	5	3	17	20	4,5	croquettes supermarché (?)	3
31	Border Collie	2	8	4	19	22	4,5	croquettes Hill's poulet	1
32	Petit Bleu de Gascogne	1	10	4	18	25	20	restes, riz, viande, croquettes bas de gamme (?)	4
33	Ariégeois X Grand Bleu de Gascogne	2	10,58	4	25	30	20	restes, riz, viande, croquettes bas de gamme (?)	4
34	Berger Allemand	2	8,08	4	35	42	7	croquettes Gamm Vert (?)	2
35	Griffon Bleu de Gascogne	1	7,16	4	27	35	16	croquettes animalerie (?) + complément minéral (?)	4
36	Border Collie	1	7,5	4	16	22	4	restes de table, pain	3
41	Golden Retriever	4	0,91	2	34	35	3,5	croquettes "RC Maxi Junior"	1
42	Rottweiler	4	0,2	1	7,5	8	3	croquettes "RC Maxi Junior"	1
43	Rottweiler	3	0,75	1	36	40	12	croquettes "RC Giant Junior"	2
44	Dalmatien	4	0,58	1	18	18	8	croquettes "Kilina" (Animalia)	2
45	Rottweiler	4	0,67	1	45	45	13	croquettes "RC Maxi Junior"	2
46	Berger Allemand	4	0,42	1	21	21	7	croquettes "RC Maxi Junior"	2
51	Doberman	3	3,5	2	34,6	38	16	croquettes Proplan Saumon Adult	3
52	Caniche nain	3	1,25	2	3,8	4,2	15	croquettes "Pedigree Pal", restes	2
53	Cocker Anglais	4	2,42	2	13	13,5	11	croquettes supermarché « Orlando »	1

54	Boxer	3	3	2	29	33	11	croquettes "RC Maxi Adult"	3
55	Hovawart	4	1,08	2	41	43	4,33	croquettes "RC Giant Junior"	1
56	Sharpei	4	3,42	2	28	30	13	croquettes Proplan Saumon Adult	2
57	Berger Belge Groenendael	3	2,16	2	27	29	8	croquettes "RC Energy"	3
58	Border Collie	3	1,25	2	17	19	12	croquettes "RC Medium Adult"	2
59	Border Collie	4	2,42	2	17	18	12	croquettes "RC Medium Adult"	3
60	Berger Belge Tervueren	4	3,75	2	30	31	12	croquettes Hill's adult agneau	1
61	Border Collie	3	6	3	22	25	3,5	croquettes "Agi+"	3
62	Colley	4	5,5	3	22	22	7	croquettes Proplan Saumon Adult	3
63	Colley	3	5,33	3	25	27	16	croquettes « Breekies »	1
64	X Griffon Nivernais	3	6,67	3	30	33	7	carcasses de canard	4
65	Grand Gascon St Ongeois	3	5,67	3	30	33	7	carcasses de canard	4
66	Courant français blanc et noir	4	6,08	3	35	35	16	croquettes animalerie (?) + complément minéral (?)	4
67	Courant français blanc et noir	4	6,08	3	35	35	16	croquettes animalerie (?) + complément minéral (?)	4
68	Courant français blanc et noir	3	6,08	3	32	35	16	croquettes animalerie (?) + complément minéral (?)	4
71	Griffon Bleu de Gascogne	3	13,75	4	25	27	21	pain, riz, pâtes, croquettes bas de gamme (?)	4
72	Griffon Nivernais X Grand Bleu de Gascogne	3	7,5	4	28	31	21	pain, riz, pâtes, croquettes bas de gamme (?)	4
73	Grand Bleu de Gascogne	4	7,67	4	30	30	7	carcasses de canard	4
74	Border Collie	4	12	4	20	20	1	restes, pain	2
81	Beauceron	5	0,2	1	12,2	12,2	4	croquettes Proplan puppy	2
82	Beauceron	5	0,2	1	13,5	13,5	4	croquettes Proplan puppy	2
83	Boxer	5	0,25	1	8,7	8,7	1,5	croquettes "Puppy Chow" Junior	2
84	X Labrador retriever	5	0,91	2	28	28	18	croquettes « RC » Maxi Adult	1
85	Bouledogue Français	5	0,75	1	14	14	3	croquettes Hill's puppy poulet	2
86	Labrador Retriever	5	0,58	1	32	32	3,5	croquettes Hill's puppy poulet	2
87	Beauceron	5	0,83	1	35	35	12	croquettes Eukanuba adult + 20% « RC Maxi Adult »	2
91	Golden Retriever	5	1,58	2	35	35	15	croquettes « RC Maxi Adult »	2
92	Braque de Weimar	5	2,5	2	32,7	32,7	4,5	croquettes « RC Maxi Adult »	1
93	Dogue du Tibet	5	2,83	2	37	37	12	croquettes "RC Sensible"	2
94	Cocker Anglais	5	2,25	2	13	13	3	croquettes "RC Medium Adult"	3
95	Berger Belge Tervueren	5	1	2	25	25	6	croquettes "RC Maxi Adult"+"Friskies"	2
96	Cocker Américain	5	2,16	2	10,9	10,9	12	croquettes "RC mini Adult"	1
97	Berger Belge Malinois	5	2,16	2	34	34	12	croquettes "Pedigree Pal"	2
98	Dogue Allemand	5	2,83	2	80	80	2,5	croquettes "Canailou" + Pâtes	2

101	Berger Belge Tervueren	5	5	3	24	24	16	croquettes "Bio Meal"	3
102	Golden Retriever	5	4,58	3	33	33	13	croquettes "RC" DR21	1
103	Epagneul Papillon	5	4,25	3	3,8	3,8	7	croquettes "Proplan" performance	3
104	Berger Allemand	5	5,5	3	30	30	16	croquettes « Flatazor »	3
105	Grand Bleu de Gascogne X Bruno du Jura	5	6,67	3	25	25	7	carcasses de canard	4
111	Beauceron	5	9	4	39	39	4	croquettes Proplan Saumon Adult	3
112	Spitz X Papillon	5	9,67	4	18	18	12	croquettes "RC Medium Adult"	3
113	Berger Allemand	5	7	4	35	35	12	croquettes supermarché (?)	3
114	Beagle	5	12	4	16	16	20	dinde + soupe supermarché (?)	2
115	Cocker anglais	5	9	4	15	15	5	croquettes Hill's c/d	2
121	Rottweiler	7	0,91	2	45	41	7	croquettes Proplan +pâtes + boîtes bas de gamme	2
131	Golden Retriever	7	3,25	2	33	30	1	croquettes supermarché bas de gamme (?)	1
132	Labrador retriever	6	3	2	35	33	16	croquettes "Breekies"	1
133	Labrador Retriever	6	1,08	2	36	34	2,5	croquettes "RC Maxi Adult"	2
134	Cocker anglais	6	2,58	2	15	14	13	croquettes Hill's adult poulet	2
141	Labrador Retriever	7	6	3	44,5	40	12	croquettes "RC" DR21	1
142	Schnauzer Géant	7	6	3	55	50	4	croquettes "Flatazor"	3
143	Golden Retriever	6	7,42	4	37	35	14	croquettes "Eukanuba"adult + poulet	2
144	Bruno du Jura X Porcelaine	6	4,67	3	30	28	7	carcasses de canard	4
151	Border Collie	7	9,83	4	24	21	3	restes de viande, croquettes supermarché (?)	2
152	Berger Allemand	6	9,5	4	37	35	17	croquettes "Flatazor"	3
171	Labrador Retriever	8	3,16	2	47	40	3,5	croquettes "Breekies"	2
172	Labrador Retriever	8	3,16	2	38	32	2,5	croquettes "Breekies"	2
173	Westie	8	2,67	2	11	9	12	croquettes Proplan Adult	2
181	Berger Belge Groenendael	8	6,67	3	43	35	4	croquettes 1 ^{er} prix Jardiland	2
191	Beauceron	8	7,58	4	54,5	45	18	pâtes, croquettes Pedigree	2
192	Labrit	8	11	4	18	15	20	dinde + soupe supermarché (?)	2
193	Rottweiler	8	10,33	4	55	46	1	croquettes Hill's i/d	2
194	Berger Belge Malinois	9	11,33	4	47	35	14	Restes, croquettes supermarché (?), boîtes	2

Abréviations : X : croisé, RC : Royal Canin

Annexe 3 : Répartition des chiens en fonction de la race, de l'âge, de l'état corporel et de l'activité

BCS		1		2				3				4				5				6				7			8,5	Total	
Activité		3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	2		
racés	classe d'âge																												
Bergers allemands	1											1																1	
	3																												1
	4				1																								3
Bergers belges	2	1							1			1																5	
	3	1		1																								4	
	4																											1	
Beaucerons	1																											3	
	2				1																							1	
	4																											2	
Border Collies et Colleys	2				1				1				1															3	
	3				1				1	1			1															4	
	4	1		1									1													1		4	
Labrit	4																											1	
Rottweilers	1								1			1	1															4	
	4																											1	
Dobermann	2								1																			1	
Schnauzer géant	3																											1	
Hovawart	2												1															1	
Sharpei	2													1														1	
Boxer	1																											1	
	2																											1	
Bouledogue français	1																											1	
Dogue du Tibet	2																											1	
Dogue Allemand	2																											1	
Jack Russel Terrier	2				1																							1	
Westie	2																											1	
Chiens courants	1												1															1	
	2		4				1								1													6	
	3		3																									10	
	4		2				1								1													7	
Retrievers	1												1															2	
	2																											6	
	3																											2	
	4																											1	
Cockers spaniels	2												1															4	
	4																											1	
Caniche	2																											1	
Epagneul papillon	3																											1	
Chiens de races croisées	1																											1	
	2																											1	
	3																											1	
	4																											1	
Total		3	9	4	2	2	3	2	2	4	5	5	5	2	3	4	14	6	1	1	2	2	1	1	2	2	1	8	95

Annexe 4 : Correspondance « Déplacement chimique » – « Composés »
(d'après données bibliographiques)

composés	déplacements chimiques ($\delta^1\text{H}$) en ppm	Sources
acétate	1,93s	Gavaghan <i>et al.</i> , 2000
2-amino-adipate	3,75t; 2,25t; 1,89m; 1,65m	Bollard <i>et al.</i> , 2005
2-hydroxyglutarate	1,85m; 2,01m; 2,26m; 2,30m; 5,25dd	Holmes <i>et al.</i> , 1997
2-oxoglutarate	3,01t; 2,45t	Bollard <i>et al.</i> , 2005
2-oxoisocaproate	0,92; 2,64	Wang <i>et al.</i> , 2004
2-oxoisovalérate	1,12	Wang <i>et al.</i> , 2004
3D-hydroxybutyrate	1,20d; 1,23d; 2,31dd; 2,41dd; 4,16dt	Bollard <i>et al.</i> , 2005
acétate	1,93s	Holmes <i>et al.</i> , 1997
acétoacetate	2,24s	Holmes <i>et al.</i> , 1997
acétone	2,21s	Holmes <i>et al.</i> , 1997
acides biliaires	0,63s; 0,69s	Holmes <i>et al.</i> , 1997
alanine	1,49d; 3,79q	Nicholls <i>et al.</i> , 2003
allantoïne	5,36s	Nicholls <i>et al.</i> , 2003
α -glucose	3,40dd; 3,54dd; 3,70dd; 3,73t; 3,79dd; 3,86dd; 5,23d	Nicholls <i>et al.</i> , 2003
arginine	3,25t	Holmes <i>et al.</i> , 1997
β -alanine	2,32t; 2,56t; 3,19t; 3,32t	Bollard <i>et al.</i> , 2005
β -glucose	3,25t, 3,40dd; 3,48m; 3,78dd; 3,90dd; 4,64d	Nicholls <i>et al.</i> , 2005
bétaïne	3,29s; 3,89s	Bollard <i>et al.</i> , 2001
choline	3,23s	Holmes <i>et al.</i> , 1997
citrate	2,72d; 2,56d	Bollard <i>et al.</i> , 2005
citrulline	3,76 t; 3,15 q; 1,88 m; 1,52 m	Bollard <i>et al.</i> , 2005
créatine	3,94s; 3,04s	Bollard <i>et al.</i> , 2005
créatinine	4,05s; 3,04s; 2,94s; 3,89s	Bollard <i>et al.</i> , 2005
dihydroxyacétone	4,35s	Holmes <i>et al.</i> , 1997
diméthylglycine	2,93s; 3,72s	Nicholls <i>et al.</i> , 2005
formate	8,46s	Holmes <i>et al.</i> , 1997
fumarate	6,53s	Holmes <i>et al.</i> , 1997
glycine	3,58s	Bollard <i>et al.</i> , 2001
guanidino-acétate	3,80 s	Gavaghan <i>et al.</i> , 2000
hippurate	3,95s; 3,97d; 7,55t; 7,64t; 7,73d; 7,83d	Bollard <i>et al.</i> , 2005, Nicholls <i>et al.</i> , 2003
histidine	7,28s; 8,38s	Holmes <i>et al.</i> , 1997
hypotaurine	2,66t; 3,27t	Bollard <i>et al.</i> , 2005
isoleucine	0,93t; 1,02d	Holmes <i>et al.</i> , 1997
lactate	1,33d; 4,11q	Bollard <i>et al.</i> , 2005
leucine	0,94d	Holmes <i>et al.</i> , 1997
3-HPPA ^(*)	2,48t; 2,84t; 6,76d; 6,80s; 6,92dd; 7,27t	Nicholls <i>et al.</i> , 2003
4-HPPA ^(*)	2,45t; 2,81t; 6,85d; 7,18d	Nicholls <i>et al.</i> , 2003
malate	2,41m; 2,64m; 4,29q	Wang <i>et al.</i> , 2004
malonate	3,16	Wang <i>et al.</i> , 2004
oxaloacétate	2,35s	Wang <i>et al.</i> , 2004
phénylacétylglycine	3,68; 3,76; 7,36	Wang <i>et al.</i> , 2004
phenylalanine	7,35m; 7,42m	Wang <i>et al.</i> , 2004
propionate	1,04; 2,16	Wang <i>et al.</i> , 2004
pyruvate	2,37s	Wang <i>et al.</i> , 2004
spermine	1,76m	Gavaghan <i>et al.</i> , 2000
succinate	2,42s	Bollard <i>et al.</i> , 2005

taurine	3,27t; 3,43t	Bollard <i>et al.</i> , 2005
thréonine	1,34d	Nicholls <i>et al.</i> , 2003
TMAO ^(*)	3,26s	Nicholls <i>et al.</i> , 2003
triméthylamine	2,88s	Bollard <i>et al.</i> , 2005
tryptophane	7,24; 7,28; 7,52; 7,71	Wang <i>et al.</i> , 2004
tyrosine	6,89m; 7,18m	Holmes <i>et al.</i> , 1997
valine	0,99d; 1,05d	Holmes <i>et al.</i> , 1997

^(*) 3-HPPA : acide 3-hydroxyphénylpropionique, 4-HPPA : acide 4-hydroxyphénylpropionique, TMAO : triméthylamine-N-oxyde.

s : singulet, **d** : doublet, **t** : triplet, **q** : quintet, **dd** : doublet de doublet, **m** : multiplet

Annexe 5 : Résultats d'études épidémiologiques sur l'état corporel de chiens et comparaison avec les résultats de cette étude.

Surpoids et obésité

Etudes tous sexes confondus.

Etude	Nombre de chiens	% de chiens en surpoids	% de chiens obèses
Armstrong <i>et al.</i> , 2004	24 975 chiens, USA	29,2	5,1
Lund <i>et al.</i> , 1999	31 484 chiens, Minnesota	22	5,5
Edney <i>et al.</i> , 1986	8 268 chiens, UK	21,4	2,9
<i>Notre étude</i>	<i>95 chiens</i>	<i>11,6</i>	<i>8,4</i>

Prévalence des excès pondéraux en fonction du sexe

Etude sur 8268 chiens, d'après Edney *et al.*, 1986.

Sexes	% de la population totale	Surpoids (% de la population totale)	Obèses (% de la population totale)
Mâles entiers	45.8%	7	0,6
Mâles castrés	3.9%	1,2	0,28
Femelles entières	29.3%	5,7	0,68
Femelles castrées	17%	6,6	1,1
Non connu	4%	0,98	0,15
Total	100%	21,4	2,9

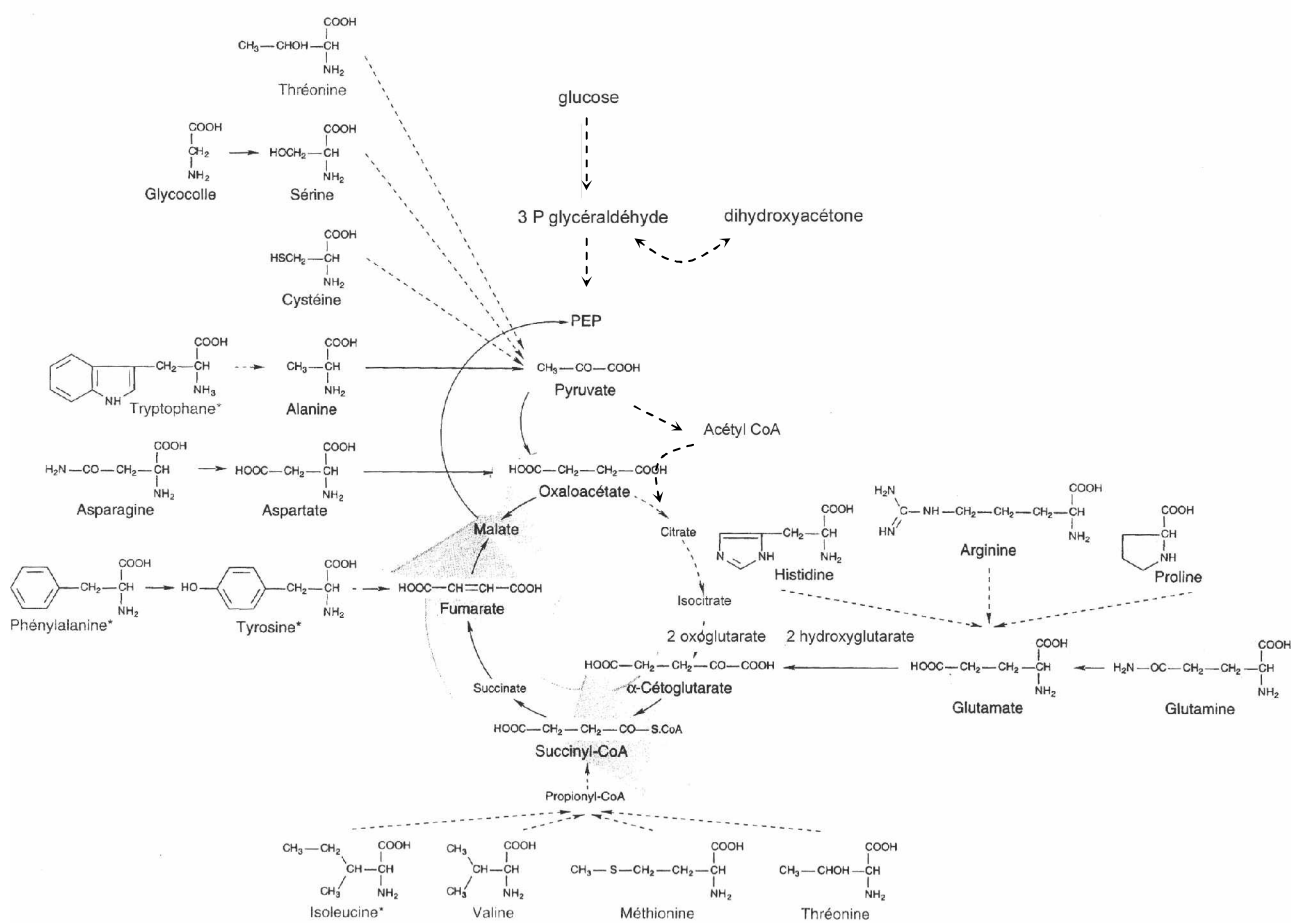
Etats corporels insuffisants

Etudes tous sexes confondus.

Etude	Nombre de chiens	% de chiens très maigres	% de chiens maigres
Lund <i>et al.</i> , 1999	31 484 chiens, Minnesota	1,8	9,8
Edney <i>et al.</i> , 1986	8 268 chiens, UK	1,9	13,5
<i>Notre étude</i>	<i>95 chiens</i>	<i>13</i>	<i>23</i>

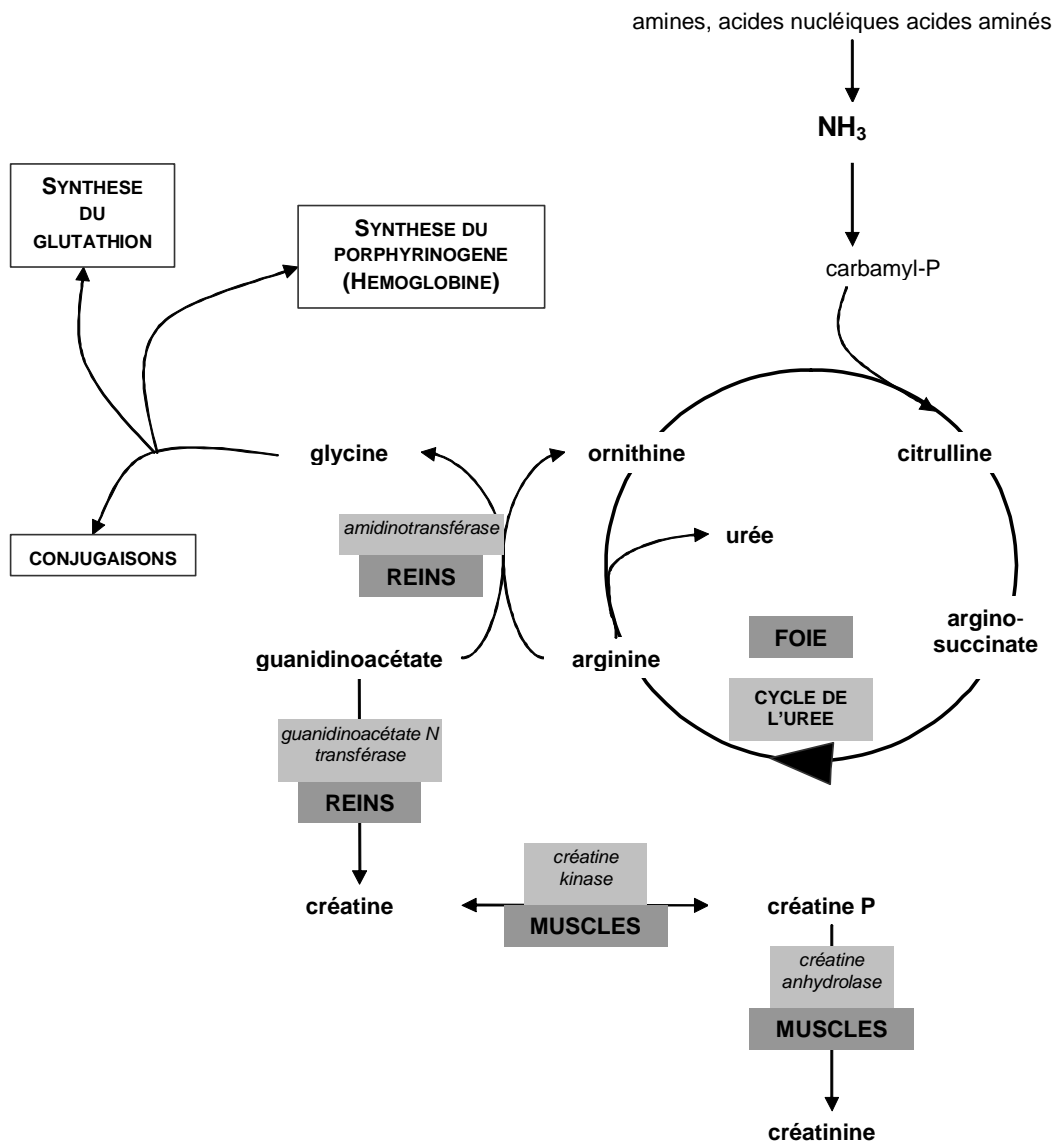
Annexe 6 : Voies métaboliques évoquées

a. Cycle de Krebs, entrée des acides aminés glucoformateurs



Adapté d'après MOUSSARD C., La biochimie : Biochimie structurale et métabolique, De Boeck, Paris, 1999, Planche 24-1, p250.

b. Métabolisme azoté



c. Métabolisme de la choline

