



Marqueurs protéiques de la tendreté de la viande bovine : étude prédictive et fonctionnelle

Nicolas Guillemin

► To cite this version:

Nicolas Guillemin. Marqueurs protéiques de la tendreté de la viande bovine : étude prédictive et fonctionnelle. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2010. Français. <NNT : 2010CLF22095>. <tel-00646978v2>

HAL Id: tel-00646978

<https://theses.hal.science/tel-00646978v2>

Submitted on 1 Dec 2011

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

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



HAL Authorization

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

N° d'ordre : 538

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal pour l'obtention du grade de

Docteur d'Université

- Spécialité Physiologie et Génétique Moléculaires -

Soutenue le 16 Décembre 2010
par

Nicolas GUILLEMIN

Marqueurs protéiques de la tendreté de la viande bovine : étude prédictive et fonctionnelle

Jury de thèse

<u>Président :</u>	M. MICHAUD Philippe	<i>Professeur, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand</i>
<u>Rapporteurs :</u>	Mme BERRI Cécile	<i>Chargée de Recherches, INRA, Tours</i>
	M. REMIGNON Hervé	<i>Professeur, ENSAT, Toulouse</i>
<u>Examineur :</u>	M. JOURNAUX Laurent	<i>Ingénieur, UNCEIA, Paris</i>
<u>Directeur de thèse :</u>	Mme PICARD Brigitte	<i>Directrice de Recherches, INRA, Clermont-Ferrand</i>
<u>Co-directeur de thèse :</u>	M. LEVEZIEL Hubert	<i>Directeur de Recherches, INRA, Limoges</i>

Laboratoire d'accueil :



Unité de Recherches sur les Herbivores (URH)
Equipe Croissance et Métabolisme du Muscle (C2M)
63122 Saint-Genès-Champanelle

A ma famille

A Chérazade

Remerciements

Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements aux membres du jury de cette thèse :

à Monsieur Philippe MICHAUD, qui me fait l'honneur de présider ce jury.

à Madame Cécile BERRI et Monsieur Hervé REMIGNON, qui ont accepté d'être rapporteurs de ce travail.

à Monsieur Laurent JOURNAUX, qui a accepté d'être examinateur de ce travail.

à Monsieur Hubert LEVEZIEL pour m'avoir accepté dans cette thèse.

à Madame Brigitte PICARD, pour m'avoir encadré tout au long de ces 3 années de thèse. Je lui adresse le plus grand merci, pour sa présence et sa disponibilité. J'ai toujours pu compter sur elle durant ces 3 années. Cela a été un grand plaisir de travailler avec elle. Merci pour sa gentillesse, ses conseils et ses attentions.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse, pour leur suivi et leurs conseils : messieurs Hervé REMIGNON, Christophe DENOYELLE et Gilles RENAND.

J'adresse un grand merci à Gilles RENAND, qui a activement participé non seulement aux diverses publications (articles, présentations et posters), mais a su consacrer beaucoup de son précieux temps pour son aide pour analyser les données et nous livrer ses avis et conseils qui ont beaucoup apportés à l'exploitation des données.

Je tiens également à remercier Jean-François HOCQUETTE pour m'avoir accueilli au sein de l'Unité de Recherches sur les Herbivores et sa participation aux diverses communications.

Je remercie sincèrement Catherine JURIE pour son aide importante dans l'analyse statistique des données, ainsi que pour la rédaction de la thèse et des diverses communications.

Un grand merci également pour Bruno MEUNIER, qui a beaucoup contribué à la mise au point du Dot-Blot, en apportant son point de vue et ses conseils, ce qui m'a souvent amené à modifier le protocole du Dot. Sans lui, cette technique n'aurait certainement pas vu le jour.

Je remercie également Isabelle CASSAR-MALEK, pour ses bons conseils et sa collaboration tout au long de la thèse, et également pour sa bonne humeur depuis le bureau juste derrière le mien.

Merci aussi à Didier MICOL, de par ses conseils sages et avisés, a permis de mieux exploiter certains résultats.

J'exprime mes remerciements pour Nicole DUNOYER et Christiane BARBOIRON : pour Nicole, m'avoir appris les Western-Blot, et pour Christiane, pour m'avoir appris à extraire les protéines, et pour leur bonne humeur à toutes les deux.

Merci également pour les autres personnes du laboratoire, avec qui les contacts furent toujours sympathiques : Anne LISTRAT, Mathieu REICHSTADT, David CHADEYRON, Geneviève GENTES, Arnaud DELAVAUD et Jean –Luc MONTEL.

De manière globale, l'équipe Croissance et Métabolisme du Muscle a constitué une vraie famille sur laquelle j'ai pu compter en toute occasion, y compris dans mes moments de « blues ». C'est un vrai déchirement de vous dire au revoir.

Je remercie Abderrahman MAFTAH pour son aide à la fin de ma licence pour m'inscrire en master, et surtout pour m'avoir mis en contact avec Hubert et Brigitte sur ce sujet de thèse, quelques jours après ma soutenance de master.

Je tiens à remercier les thésards et stagiaires rencontrés au cours de ma thèse, et particulièrement Thibaut CHAZE, Ilham CHELH, Mylène GOBERT, Guillaume KRAFT, Huijan WANG, Annabelle DUBOST, Hajer TAGA, Sylvain LERCH, Maya CHERFAOUI, Caroline NORE, Malek KAMMOUN et Sghaier CHRIKI.

Merci à Daniel TAILLANDIER de l'Unité de Nutrition Humaine pour m'avoir appris à réaliser la révélation par fluorescence.

Merci à Muriel BONNET pour ses judicieux conseils pour la partie interactome.

Merci à Marie-Jo MONSEGU pour sa bonne humeur et sa disponibilité pour les commandes, les déplacements, et autres formalités.

Merci à l'équipe Nutriments Et Métabolisme pour leur convivialité, et à l'équipe de l'abattoir expérimental de l'Unité pour leur contribution au programme MUGENE.

Merci également à toute l'équipe Ressources Techniques et Administratives, et plus particulièrement Nicolas BARRIERE et Jean-Paul BRUN. Un grand merci en particulier pour Maryse TEYSSÉDRE, qui est toujours disponible pour toutes les questions administratives, de mon inscription en thèse à la soutenance trois ans après, y compris lorsque j'ai eu besoin de nombreux justificatifs administratifs les plus délirants lors de mon contrôle fiscal (parce qu'il en faut pour prouver qu'un doctorant n'est pas un apprenti et qu'il ne travaille pas à mi-temps !)...

Je m'attaque à la partie personnelle.

Evidemment, un très grand merci à mes parents, Francis et Laurence, qui m'ont toujours soutenu tout au long de mon parcours universitaire. Sans eux, je n'aurais jamais pu réaliser ce parcours, tant par leur soutien moral mais également financier, en 5 années d'études avant la thèse pendant lesquelles nous n'avons eu droit à...rien (si ce n'est de tout payer). Un merci également à mes petites sœurs, Lucie et Astrid, parce que sinon elles vont bouder si je ne les mentionne pas ici. Enfin, non, je plaisante, merci surtout pour votre soutien aussi !

Un grand merci à mes grands-parents paternels, Claude et Colette, qui eux aussi ont toujours été là. De même pour mon oncle Philippe et ma tante Christine, qui m'ont hébergé pendant quelques mois durant mon Master, une période très « cool » qui m'a néanmoins permis de négocier ce master dans les meilleures conditions.

Je remercie également celle qui a changé ma vie, Chérazade FATNASSI. Merci également à ses parents, Neji et Laurence, et son frère Sofiane, pour leur soutien.

Merci à mes amis de lycée : Christophe COUDERC, Jérôme MEUNIER, Nicolas RUAUD, Agnès SKAPSKI et Benjamin MENARD. Merci également aux amis rencontrés à la fac, en particulier Thomas AUMETTRE.

Un merci pour Jérôme GELLY, Mathias PIALOUX, Amaury BERRIER, Blaise TARTIERE, Tommy VION, Tom BOISSONNET, Pierrick MATHEAUD et Claire BOUSQUET, les guitaristes, bassistes et chanteurs que j'ai côtoyés et avec qui j'ai eu le grand plaisir de jouer durant 3 années rock 'n roll, avec de grands moments comme le « Zombie » des Cranberries et le « Born to be wild » devant le centre Jaude !

De manière globale, je remercie toutes les personnes avec qui les contacts furent enrichissants et sympathiques.

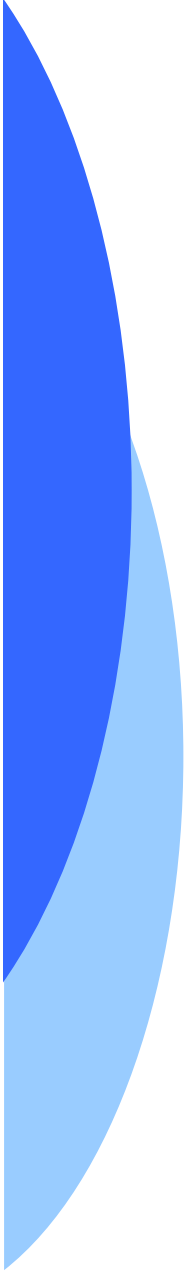
Enfin, j'adresse des remerciements très spéciaux à Georges LUCAS, merci de me faire rêver depuis des années, dans une galaxie lointaine, très lointaine...

*N'essaie pas. Fais-le, ou ne le fais pas. Mais il n'y a pas
d'essai.*

*Maître Yoda à Luke Skywalker lors de son entraînement Jedi
sur la planète Dagobah*

Star Wars, Episode V, l'Empire contre-attaque





Sommaire

SOMMAIRE

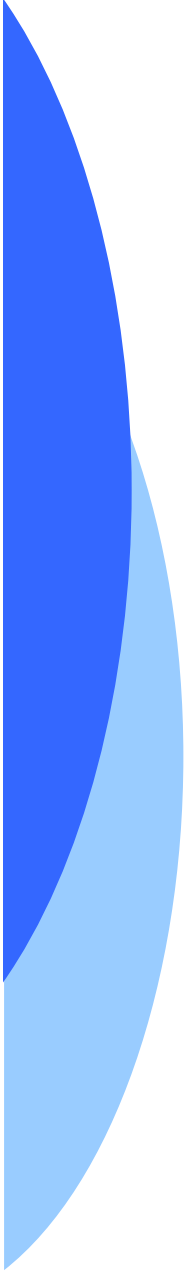
Communications	1
Abréviations	5
Liste des figures	6
Liste des tableaux	9
Contextes, enjeux, et objectifs de la thèse	11
Introduction bibliographique	14
I Les bovins	14
I.1 Les foyers de domestication	15
I.1.1 Foyer du Croissant Fertile	16
I.1.2 Foyer de l'Inde	16
I.1.3 Foyer Nord-Africain	16
I.1.4 Autres foyers	17
I.2 Influences d'<i>Homo sapiens</i> sur les lignées <i>Bos taurus</i> et <i>Bos indicus</i>	17
I.2.1 Bovins africains	17
I.2.2 Bovins européens	17
I.3 Conséquences pour <i>Homo sapiens</i>	18
I.3.1 Civilisation	18
I.3.2 Génétique et physiologie	19
I.3.3 Mythologie	19
I.4 Les différentes races bovines et l'exception française	20
II Le muscle squelettique strié	22
II.1 Structures et fonctions	23
II.1.1 Les fibres	24
II.1.2 Les myofibrilles	26
II.1.3 Les sarcomères	27
II.1.4 Les costamères	27
II.1.5 La ligne M	28
II.1.6 Le disque Z	29
II.1.7 Les filaments épais	29
II.1.8 Les filaments fins	30
II.1.9 Le collagène	31
II.1.10 Les systèmes protéasiques	32

II.1.10.1	Calpaïnes	32
II.1.10.2	Cathepsines	33
II.1.10.3	Protéasome 20S	33
II.1.10.4	Caspases	34
II.1.10.5	Matrice metallopeptidase	34
II.1.10.6	Peptidase à sérine	35
II.2	La contraction musculaire	35
II.3	Le métabolisme énergétique de la fibre musculaire	36
II.3.1	La glycolyse	36
II.3.2	Production de lactate	37
II.3.3	La voie aérobie	37
II.3.4	Intégration des différentes voies	38
II.4	Les protéines chaperonnes	38
II.4.1	Hsp20	39
II.4.2	Hsp40	39
II.4.3	Hsp60	39
II.4.4	Hsp70	39
II.4.5	Hsp90	40
II.4.6	Hsp100	40
II.4.7	Quelques mécanismes	40
II.5	L'apoptose	40
III	Les qualités sensorielles de la viande bovine	42
III.1	La couleur	42
III.2	La flaveur	42
III.3	La jutosité	43
III.4	La tendreté	43
III.5	Caractéristiques de la tendreté	46
III.5.1	Les fibres musculaires	46
III.5.2	Le collagène	49
III.5.3	Les lipides	51
III.5.4	Les systèmes protéasiques	51
III.5.5	L'apoptose	53
III.5.6	Conclusion	54
IV	Génomique et tendreté	54
IV.1	Le génome bovin	55

IV.2	Marqueurs de la tendreté	56
IV.2.1	Marqueurs basés sur des polymorphismes	57
IV.2.1.1	CAPN1	57
IV.2.1.2	CAST	58
IV.2.1.3	LOX	58
IV.2.1.4	Tests commerciaux de la tendreté	59
IV.2.1.4.i	Test GeneSTAR Tenderness	59
IV.2.1.4.ii	Test Igenity TenderGENE	59
IV.2.1.4.iii	Mode opératoire	59
IV.2.2	Marqueurs basés sur la variation d'expression des gènes	60
IV.2.2.1	DNAJA1	60
IV.2.2.2	Autres marqueurs génétiques de la tendreté	61
V	La protéomique et la tendreté des viandes	61
V.1	Définition	61
V.2	Recherches sur la tendreté des viandes	62
V.2.1	Chez le porc	62
V.2.2	Chez le bovin	63
VI	Bilan de l'état des connaissances	68
	Matériels et Méthodes	70
I	Animaux	70
II	Caractérisation des muscles et de la viande	70
II.1	Données phénotypiques	70
II.2	Analyse mécanique – Test Warner-Bratzler	71
II.3	Analyse sensorielle – Estimation de la note de tendreté de la viande	71
III	Quantification des protéines	72
III.1	Démarche expérimentale	72
III.2	Extraction des protéines et dosage	72
III.3	Validation de la spécificité des anticorps par Western-Blot	73
III.4	Protéines testées	76
III.5	Quantification par Dot-Blot	76
IV	Analyses statistiques	77
IV.1	Effets muscle et type d'animal	77

IV.2	Analyse de corrélations	78
IV.3	Analyse descriptive	78
IV.4	Analyse prédictive globale	79
IV.5	Analyse prédictive « ciblée »	79
V	<i>Interactome</i>	80
	<i>Résultats et Discussion</i>	81
I	<i>Choix méthodologiques</i>	81
I.1	Stratégie initiale	81
I.2	Développements techniques	81
I.2.1	Mise au point de la révélation d'anticorps primaire par fluorescence	81
I.2.2	Validations de la spécificité des anticorps primaires	83
I.2.3	Mise au point du Dot-Blot de quantification de protéines	84
	Article Journal of Physiology and Pharmacology	85
I.3	Optimisation du protocole de Dot-Blot	94
II	<i>Résultats techniques sur l'utilisation du Dot-Blot</i>	94
III	<i>Effets muscle et type d'animal</i>	95
	Article Animal	97
IV	<i>Relations entre abondance des protéines et la tendreté</i>	108
IV.1	Analyse par corrélations	108
IV.1.1	Muscle LT	109
IV.1.2	Muscle ST	109
IV.1.3	Muscles LT et ST cumulés	110
IV.2	Analyse descriptive	111
	Article Journal of Animal Sciences	112
IV.3	Analyse prédictive globale	138
IV.3.1	Equations de prédiction	138
IV.3.2	Equation de prédiction de la mesure de Warner-Bratzler du muscle ST	139
IV.3.3	Equation de prédiction de la mesure de Warner-Bratzler du muscle LT	139
IV.3.4	Equation de prédiction de la note de tendreté globale du muscle LT	140
IV.3.5	Marqueurs communs	141
IV.3.6	Echantillons dits « imprédictibles »	142
IV.3.7	Conclusions de l'Analyse Prédictive Globale	143
IV.4	Analyse prédictive ciblée	144

IV.4.1	Muscle LT	144
IV.4.2	Muscle ST	145
IV.5	Synthèse des résultats sur la tendreté	145
IV.5.1	Les validations de protéines en tant que marqueurs de la tendreté	145
IV.5.2	Les équations de prédiction de la tendreté	149
V	<i>Interactome fonctionnel</i>	149
	Article Journal of Proteomics	151
	<i>Discussion générale</i>	178
I	<i>Dot-Blot : un nouvel outil</i>	178
II	<i>Compréhension biologique de la tendreté</i>	179
II.1	Relations entre HSP20s, HSP70s, apoptose, et tendreté	179
II.2	Relation entre stress oxydant et tendreté	180
II.3	La tendreté : origine multifactorielle	181
II.4	Comment influencer la tendreté du vivant de l'animal ?	181
III	<i>Modélisation et prédiction de la tendreté</i>	182
III.1	Différences avec les études antérieures dans la validation de marqueurs	182
III.2	Mise au point d'équations de prédiction	183
III.3	Les limites du travail	184
III.4	L'évaluation de la tendreté sensorielle	184
	<i>Conclusion et Perspectives</i>	186
	<i>Références bibliographiques</i>	189



Communications

COMMUNICATIONS

Articles scientifiques (revues avec comité de lecture)

- **GUILLEMIN N., MEUNIER B., JURIE C., CASSAR-MALEK I., HOCQUETTE J-F., LEVEZIEL H., PICARD B. (2009).** Validation of a Dot-Blot quantitative technique for large-scale analyses of beef tenderness. *Journal of Physiology and Pharmacology* 60 (Suppl 3) : 91-97.
- **GUILLEMIN N., CASSAR-MALEK I., HOCQUETTE J-F., JURIE C., MICOL D., LISTRAT A., LEVEZIEL H., RENAND G., PICARD B. (2009).** La maîtrise de la tendreté de la viande bovine, un futur proche : identification de marqueurs phénotypiques. *INRA Production Animale* 22 : 331-344.
- **CASSAR-MALEK I., GUILLEMIN N., HOCQUETTE J-F., MICOL D., BAUCHART D., PICARD B. (2010).** Expression of DNAJA1 in bovine muscles according to developmental age and management factors. *Animal* (sous presse).
- **GUILLEMIN N., JURIE C., CASSAR-MALEK I., HOCQUETTE J-F., RENAND G., PICARD B. (2010).** Variations in the abundance of 24 proteins biomarkers of beef tenderness according muscle and animal types. *Animal* (sous presse).
- **GUILLEMIN N., JURIE C., RENAND G., HOCQUETTE J-F., LEPETIT J., LEVEZIEL H., PICARD B. (2010).** Different phenotypic and proteomic markers explain variability of beef tenderness across muscles. *Journal of Animal Sciences* (accepté).
- **GUILLEMIN N., BONNET M., JURIE C., PICARD B. (2010).** Fonctionnal analysis of beef tenderness. *Journal of Proteomics* (soumis).

Article dans un livre

➤ PICARD B., CASSAR-MALEK I., **GUILLEMIN N.**, BONNET M (2010). Quest for novel muscle pathway biomarkers by Proteomics in beef production. *Comprehensive Biotechnology*, 2nd edition - Proteomics.

Présentations orales

➤ **GUILLEMIN N.**, LEVEZIEL H., PICARD B. Analyse approfondie de marqueurs de la tendreté de la viande bovine. Etude de fonctionnalité des gènes et analyses des polymorphismes. *Conseil Scientifique de l'URH, Theix – 13 Mars 2008.*

➤ **GUILLEMIN N.**, LEVEZIEL H., RENAND G., LEPETIT J., MICOL D., HOCQUETTE J-F., PICARD B. Validation of potential beef tenderness markers and interpretation of their biological functions. *International Symposium for Young Scientists, Lublin, Poland – 9 et 10 Septembre 2008.*

➤ **GUILLEMIN N.**, MEUNIER B., LEVEZIEL H., RENAND G., LEPETIT J., HOCQUETTE J-F., PICARD B. Validation de marqueurs protéiques de la tendreté de la viande bovine : choix méthodologiques. *12^{èmes} Journées Sciences du Muscle et Technologies des Viandes, Tours – 8 et 9 Octobre 2008.*

➤ **GUILLEMIN N.**, LEVEZIEL H., RENAND G., MICOL D., HOCQUETTE J-F., PICARD B. Validation d'un marqueur potentiel de la tendreté de la viande bovine. *15^{èmes} Rencontres Recherches Ruminants, Paris – 3 et 4 Décembre 2008.*

➤ **GUILLEMIN N.**, LEVEZIEL H., PICARD, B. Analyse approfondie de marqueurs de qualité sensorielle de la viande bovine, étude de fonctionnalité des gènes et analyses des polymorphismes. *11^{ème} Séminaire des thésards du département de Génétique Animale, Jouy-en-Josas – 23 et 24 Mars 2009.*

➤ **GUILLEMIN N., LEVEZIEL H., PICARD B.** Analyse approfondie de marqueurs de qualité sensorielle de la viande bovine, étude de fonctionnalité des gènes et analyses des polymorphismes. *Conseil Scientifique de l'URH, Theix – 9 Avril 2009.*

➤ **GUILLEMIN N., LEVEZIEL H., PICARD B.** Analyse approfondie de marqueurs de qualité sensorielle de la viande bovine, étude de fonctionnalité des gènes et analyses des polymorphismes. *Journées de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé, Clermont-Ferrand – 14 et 15 Mai 2009.*

➤ **GUILLEMIN N., JURIE C., MEUNIER B., LEVEZIEL H., HOCQUETTE J-F., PICARD B.** Stratégie de phénotypage haut débit de la tendreté de la viande bovine. *3èmes Journées d'Animation Scientifique du Département PHASE, Tours – 7 et 8 Octobre 2009.*

➤ **GUILLEMIN N., LEVEZIEL H., PICARD B.** Analyse approfondie de marqueurs de qualité sensorielle de la viande bovine, étude de fonctionnalité des gènes et analyses des polymorphismes. *Conseil Scientifique de l'URH, Theix – 26 Mars 2010.*

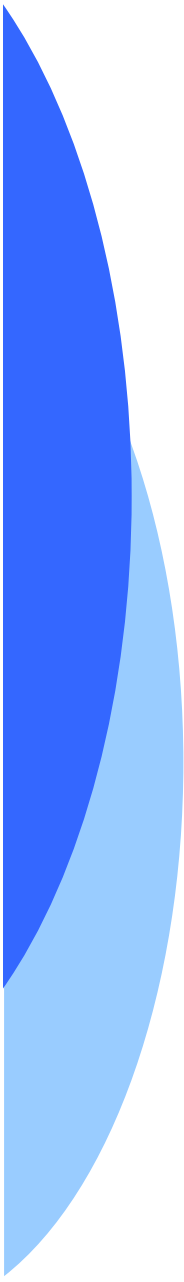
➤ **GUILLEMIN N., JURIE C., MICOL D., RENAND G., HOCQUETTE J-F., PICARD B.** Vers la mise au point d'équation de prédiction de la tendreté de la viande bovine. *13^{èmes} Journées Sciences du Muscle et Technologies des Viandes, Clermont-Ferrand – 19 et 20 Octobre 2010.*

Affiches

➤ **GUILLEMIN N., PICARD B., LEVEZIEL H.** Analyse approfondie de marqueurs de qualité sensorielle de la viande bovine. *10^{ème} Séminaire des Thésards du Département de Génétique Animale, Toulouse – 20 et 21 Mars 2008.*

➤ **GUILLEMIN N., LÉVEZIEL H., PICARD B.** Analyse de marqueurs de tendreté de la viande bovine : étude de fonctionnalité des gènes et analyse des polymorphismes. *Journées de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé, Clermont-Ferrand – 15 et 16 Mai 2008.*

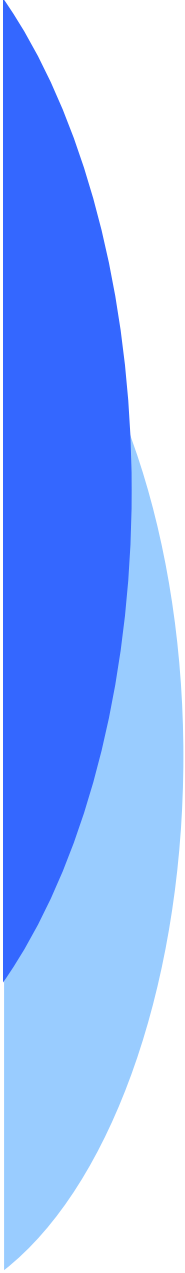
- **GUILLEMIN N., MEUNIER B., LEVEZIEL H., RENAND G., LEPETIT J., HOCQUETTE J-F., PICARD B.** Validation de marqueurs protéiques de la tendreté de la viande bovine : choix méthodologiques. *12^{èmes} Journées Sciences du Muscle et Technologies des Viandes, Tours – 8 et 9 Octobre 2008.*
- **GUILLEMIN N., LEVEZIEL H., RENAND G., MICOL D., HOCQUETTE J-F., PICARD B.** Validation d'un marqueur potentiel de la tendreté de la viande bovine. *15^{èmes} Rencontres Recherches Ruminants, Paris – 3 et 4 Décembre 2008.*
- **GUILLEMIN N., LEVEZIEL H., JURIE C., HOCQUETTE J-F., PICARD B.** Effect of muscle and animal types on the expression of HSPs in cattle muscle. *XIth International Symposium on Ruminant Physiology, Clermont-Ferrand – 6 au 9 Septembre 2009.*
- **GUILLEMIN N., JURIE C., RENAND G., HOCQUETTE J-F., LEPETIT J., LEVEZIEL H., PICARD B.** Mise en équation de la tendreté de la viande bovine à partir de validations de marqueurs potentiels. *16^{èmes} Rencontres Recherches Ruminants, Paris – 2 et 3 Décembre 2009.*
- **GUILLEMIN N., JURIE C., MICOL D., RENAND G., HOCQUETTE J-F., PICARD B.** Vers la mise au point d'équation de prédiction de la tendreté de la viande bovine. *13^{èmes} Journées Sciences du Muscle et Technologies des Viandes, Clermont-Ferrand – 19 et 20 Octobre 2010.*
- **GUILLEMIN N., JURIE C., MICOL D., RENAND G., HOCQUETTE J-F., PICARD B.** Prediction equations of beef tenderness: implication of oxidative stress and apoptosis. *BIT Life Sciences' 2nd World DNA and Genome Day, Dalian (Chine) – 25 au 29 Avril 2011.*



Abréviations

ABBREVIATIONS

ADN : Acide Dexoyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ATP : Adénosine TriPhosphate
CV : Coefficient de Variation
Da : Dalton
DTT : DiThioThréitol
ECL : Enhanced ChemiLuminescence
ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FLUO : Fluorescence
GO : Gene Ontology
HSP : Heat Shock Protein
LT : *Longissimus Thoracis*
PBS : Phosphate-Buffered Saline
PCR : Polymerase Chain Recation
PVDF : PolyVinyliDene Fluoride
QTL : Quantitative Trait Loci
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
SDS-PAGE : Sodium Dodécyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
ST : *SemiTendinosus*
Tec : Tonne équivalent carcasse
TG : note de tendreté sensorielle attribuée par un jury de dégustation (échelle de 1 à 10)
T-TBS : Tween20 Tris-Buffered Saline
WB : mesure de la dureté de la viande par Warner-Bratzler en N / cm²



Liste des figures

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Histoire et migration des bovins sous influence humaine depuis le Néolithique

Figure 2 : Evolution naturelle et sélection humaine des bovins

Figure 3A : L'auroch de Lascaux

Figure 3B : L'enlèvement d'Europe par Zeus en taureau

Figure 3C : Une vache sacrée en Inde

Figure 3D : Deux vaches célèbres représentant leurs produits

Figure 4 : Localisation des principales races bovines françaises

Figure 5 : Quelques races bovines françaises

Figure 6 : Quelques races bovines étrangères

Figure 7 : Différents systèmes d'élevage entre les Etats-Unis et la France

Figure 8 : Organisation hiérarchique du muscle squelettique strié

Figure 9 : Le muscle squelettique strié

Figure 10 : La fibre musculaire

Figure 11 : La myofibrille

Figure 12 : Le sarcomère

Figure 13 : Le filament épais

Figure 14 : Le filament fin

Figure 15 : Structure cristallographique de la sous-unité catalytique de μ -calpaïne de *Rattus norvegicus*

Figure 16 : Structure cristallographique de la cathepsine B de *Bos taurus*

Figure 17 : Structure cristallographique du protéasome 20S de *Bos taurus*

Figure 18 : Structure cristallographique de la caspase 7 de *Homo sapiens*

Figure 19 : Structure par rayons X d'un complexe de la MMP13 collagénase3 avec son inhibiteur Timp-2 de *Bos taurus*

Figure 20 : Structure cristallographique de la trypsine complexée avec l'inhibiteur Xa de *Bos taurus*

Figure 21 : Contraction musculaire

Figure 22 : Voie de la glycolyse

Figure 23 : Voies anaérobie et aérobie

Figure 24 : Chaîne respiratoire mitochondriale

Figure 25 : Intégration des différentes voies métaboliques dans la fibre musculaire

Figure 26 : Voies d'activation de l'apoptose par les caspases

Figure 27 : Evolution de la tendreté de la viande au cours de la maturation

Figure 28 : Test de Warner-Bratzler

Figure 29 : Caractéristiques des fibres influençant la tendreté

Figure 30 : Les différentes phases de l'évolution de la dureté du muscle au cours du temps après l'abattage

Figures 31A, 31B et 31C : Prélèvement des poils de queue de bovin en vue de la réalisation d'un test de prédiction de la tendreté de l'animal (Igenity TenderGene).

Figure 32 : Rapport des résultats des génotypages

Figure 33 : Représentation en Box-Plot des mesures de Warner-Bratzler

Figure 34 : Représentation en Box-Plot des notes de Tendreté Sensorielle

Figure 35 : Principe des révélations d'anticorps par chémiluminescence et fluorescence

Figure 36 : Exemples de signaux obtenus par Western-Blot en ECL et en FLUO sur Hsp27

Figure 37 : Exemples de validation / invalidation d'anticorps primaires

Figure 38 : Illustration d'une quantification par Dot-Blot de la protéine Hsp20

Figure 39 : Différences entre les valeurs mesurée et prédites pour le ST-WB (Première équation)

Figure 40 : Différences entre les valeurs mesurée et prédites pour le LT-WB (Première équation)

Figure 41 : Différences entre les valeurs mesurée et prédites pour le LT-TG (Première équation)

Figure 42 : Différences entre les valeurs mesurée et prédites pour le ST-WB (Seconde équation)

Figure 43 : Différences entre les valeurs mesurée et prédites pour le LT-WB (Seconde équation)

Figure 44 : Différences entre les valeurs mesurée et prédites pour le LT-TG (Seconde équation)

Figure 45 : Différences entre les valeurs mesurée et prédites pour le ST-WB – Imprédictibles (Seconde équation)

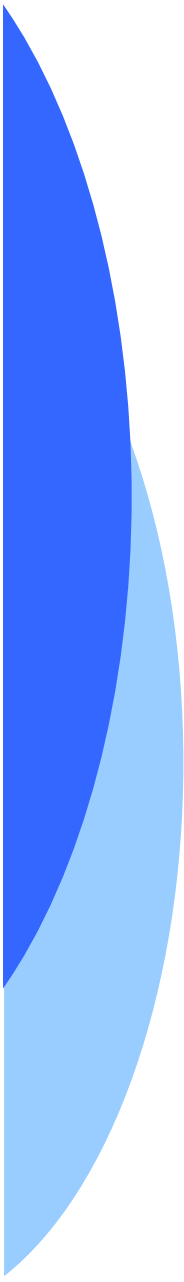
Figure 46 : Différences entre les valeurs mesurée et prédites pour le LT-WB – Imprédictibles (Seconde équation)

Figure 47 : Différences entre les valeurs mesurée et prédites pour le LT-TG – Imprédictibles (Seconde équation)

Figure 48 : Différences entre les valeurs mesurée et prédites pour le LT-WB (analyse ciblée)

Figure 49 : Différences entre les valeurs mesurée et prédites pour le LT-TG (analyse ciblée)

Figure 50 : Différences entre les valeurs mesurée et prédites pour le ST-WB (analyse ciblée)



Liste des tableaux

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classifications et propriétés des fibres

Tableau 2 : Scores et effets sur la tendreté en fonction des génotypes

Tableau 3 : Quelques gènes dont l'expression est reliée à la tendreté

Tableau 4 : Protéines identifiées dont l'expression est significativement différente entre l'abattage et 72 heures après

Tableau 5 : Protéines identifiées lors de la comparaison protéomique entre bovins culards et normaux

Tableau 6 : Protéines différenciellement exprimées chez les bovins culards (DM) et sélectionnés sur le potentiel de croissance (P)

Tableau 7 : Protéines identifiées dans l'étude de la tendreté de la viande chez trois races bovines, dans le lot T+

Tableau 8 : Protéines identifiées à la fois comme intervenant dans l'hypertrophie musculaire et impliquées dans des viandes de tendreté supérieure (cas du muscle *Semitendinosus*)

Tableau 9 : Protéines différenciellement exprimées dans les muscles LD et ST entre les temps T=0 et T=24

Tableau 10 : Description des mesures Warner-Bratzler et des notes de Tendreté sensorielle

Tableau 11 : Première sélection de protéines à étudier d'après la bibliographie

Tableau 12 : Coefficients de Variation en % pour différents échantillons en ECL et FLUO lors d'une quantification par Western-Blot sur Hsp27

Tableau 12 : Conditions d'utilisation en quantification par Dot-Blot des 24 anticorps

Tableau 13 : Anticorps retenus après les validations

Tableau 14 : Conditions d'utilisation en quantification des 24 anticorps retenus

Tableau 15 : Abondance des 24 protéines pour les 111 échantillons du muscle LT, normalisées et centrées

Tableau 16 : Abondance des 24 protéines pour les 111 échantillons du muscle ST, normalisées et centrées

Tableau 17 : Corrélations entre chacune des 24 protéines étudiées et la mesure Warner-Bratzler et / ou note de Tendreté sensorielle dans différents contextes

Tableau 18 : Caractéristiques des classes de tendreté globale du muscle LT

Tableau 19 : Paramètres des équations du ST-WB

Tableau 20 : Paramètres des équations du LT-WB

Tableau 21 : Paramètres des équations du LT-TG

Tableau 22 : Paramètres des équations du ST-WB - Imprédictibles

Tableau 23 : Paramètres des équations du LT-WB - Imprédictibles

Tableau 24 : Paramètres des équations du LT-TG - Imprédictibles

Tableau 25 : Résultats de l'Approche Prédictive Ciblée

Tableau 26 : Synthèse des résultats de la validation des 24 protéines comme marqueurs de tendreté obtenus par les 4 approches

Contextes, enjeux, et objectifs
de la thèse

CONTEXTES, ENJEUX, ET OBJECTIFS DE LA THESE

En 2008, la France possède un troupeau de bovins de 19,5 millions de têtes, composé à 40 % de races allaitantes et 40 % de races laitières (Données : Office de l'Élevage pour l'année 2008). C'est le cheptel le plus important d'Europe, la France étant la plus grosse productrice de viande bovine en Europe avec 1 725 milliers de tec. Elle est cependant au 8^{ème} rang mondial, derrière de gros producteurs tels que les Etats-Unis (12 163 tec), le Brésil (9 024 tec), ou la Chine (6 100 tec). La France est également le premier consommateur de viande bovine en Europe avec 1 643,5 milliers de tonnes équivalent carcasse (tec) par an. Les ménages français sont les deuxièmes consommateurs avec 26,1 kg équivalent carcasse par an et par habitant, juste derrière le Danemark.

La filière viande bovine, par sa production et sa consommation, a donc une place importante dans l'économie française. Cependant, plusieurs obstacles se posent sur le marché quant à la place de la viande bovine. D'une part, la concurrence des autres viandes est forte, notamment celles des volailles et du porc. En effet, le prix de ces dernières est très attractif (5,94 € / kg de poulet et 6,58 € / kg de porc contre 11,66 € / kg de bœuf et 14,78 € / kg de veau en 2008, en moyenne). D'autre part, la grande variabilité des qualités organoleptiques qui existe dans la viande bovine rebute le consommateur à acheter ce type de viande de manière récurrente. Il s'agit notamment de variations de la tendreté de la viande bovine. De plus, les récentes crises traversées par la filière bovine (Encéphalopathie Spongiforme Bovine, Fièvre Aphteuse) ont amené les consommateurs à remettre en question les méthodes de production afin de privilégier des filières plus écologiques, moins intensives. Enfin, les nombreuses attaques visant la consommation de viande en général, ainsi que l'élevage et l'abattage des bovins, posent un problème éthique pour certaines personnes.

Ainsi, c'est dans l'optique d'améliorer les qualités de la viande bovine vis-à-vis des consommateurs sans utilisation de techniques mal perçues par l'opinion (antibiotiques, modifications génétiques) que différents programmes de recherche se sont développés sur l'axe des qualités sensorielles de la viande bovine, afin d'apporter des outils pour déterminer objectivement les mécanismes biologiques impliqués dans la qualité des viandes. D'autre part, les récentes adhésions de pays au sein de l'Union Européenne (République Tchèque, Slovaquie...) ouvrent de nouveaux marchés à l'exportation pour la viande bovine française et l'optimisation des moyens de production sera un atout de taille pour la filière, soumise à la

concurrence d'autres pays producteurs de viande bovine (notamment les Etats-Unis, le Brésil, l'Argentine).

La tendreté de la viande bovine est le critère le plus dommageable vis-à-vis de la consommation, car c'est le principal motif de choix pour le client. Elle est très variable, car résultante d'une multitude de caractéristiques du muscle, tissu complexe. Par voie de conséquence, il est difficile pour la filière viande bovine de maîtriser la variabilité de la tendreté. Le résultat est une baisse de la consommation pour les viandes bovines, la filière viande ne disposant pas de mesures fiables de la tendreté sur l'animal vivant. Il est donc nécessaire d'apporter des outils à la filière afin de maîtriser la tendreté de la viande.

De nombreuses études ont montré une corrélation entre un certain nombre de marqueurs biologiques (ADN, ARN, protéines) et la tendreté. Certaines de ces découvertes ont permis la réalisation de tests commerciaux de prédiction de la tendreté, basés sur l'ADN, destinés aux filières viande américaine et australienne. Cependant ces tests ne fournissent pas de résultats satisfaisants dans le contexte français, dont les méthodes de production et les races utilisées sont différentes de l'Australie et des Etats-Unis.

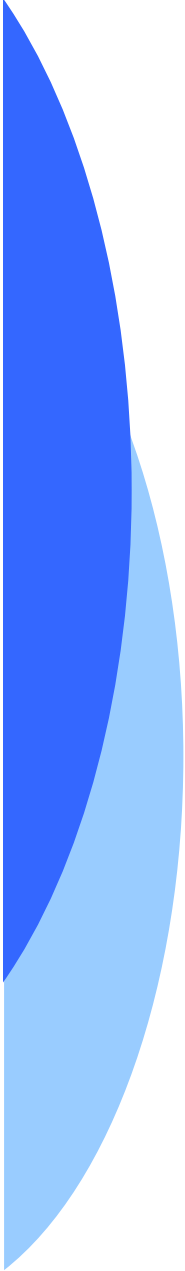
Il est donc important de développer de tels tests à destination de la filière de la viande bovine française.

L'une des missions de l'Unité de Recherches sur les Herbivores de l'INRA de Clermont-Ferrand / Theix, dévolue à l'équipe Croissance et Métabolisme du Muscle, consiste à mener des recherches afin de maîtriser la tendreté de la viande bovine, en agissant sur les systèmes de production et les caractéristiques musculaires.

L'objectif de ma thèse au sein de cette équipe est de valider comme marqueurs de la tendreté des protéines ayant été mises en évidence par génomique fonctionnelle différentielle dans plusieurs programmes durant les 4 dernières années. Ces programmes ont étudié différents contextes de races (Limousine, Charolaise, Blonde d'Aquitaine et Salers), types d'animaux (veaux, vaches, taureaux, génisses, bœufs) et muscles (*Longissimus Thoracis* et *Semitendinosus*). Dans le cadre de ma thèse, il s'agit plus particulièrement de valider des marqueurs protéiques communs à des bœufs et taurillons Charolais, dans les muscles *Longissimus Thoracis* et *Semitendinosus*, afin d'aboutir à la conception d'un test de prédiction de la tendreté à usage commercial, au niveau protéique.

La réalisation de l'objectif de la thèse nécessite la quantification d'une trentaine de protéines, mises en lumière par des études antérieures, dans différents muscles et types d'animaux. Cette validation se fera par des techniques immunologiques.

Ensuite, les données obtenues seront analysées et exploitées. Dans une première partie sera analysée l'influence des systèmes de production étudiés sur l'abondance des protéines. Puis, la seconde partie sera consacrée à la mise au point des équations de prédiction de tendreté à proprement parler. Cette partie du travail proposera des pistes pour mettre au point un test de prédiction de la tendreté. Enfin, dans une troisième partie, les corrélations et les interactions entre les protéines considérées feront l'objet d'une analyse fonctionnelle, pour aboutir à une synthèse générale des résultats. Cette synthèse fera le point sur la prédictibilité de la tendreté et les leviers d'action envisageables afin d'optimiser cette qualité sur l'animal vivant.



Introduction bibliographique

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I Les bovins

Afin de mieux connaître les animaux regroupés par le terme de « bovins », je propose une brève mise au point sur la classification des bovins au sein des mammifères, selon Linné (1758), avec les caractéristiques de chaque niveau hiérarchique.

Classe : Mammifère

Vertébrés pratiquant l'allaitement des jeunes, possédant un cœur à 4 cavités, un système nerveux et céphalique développé, et caractérisés par une respiration pulmonaire et une homothermie de leur organisme.

Sous-classe : Thériens

Mammifères ne pondant pas d'œufs, présence d'un ombilic.

Infra-classe : Euthériens

Développement des embryons dans le corps de la mère, alimentés par un placenta.

Ordre : Cetartiodactyles

Mammifères ongulés possédant un nombre pair de doigts (2 ou 4) après une perte du premier doigt. Regroupe le sous-ordre des Artiodactyles et des Cetacea, dont la séparation est remise en question par des études ADN.

Sous-ordre : Artiodactyles

Plan de symétrie du pied entre le 3^{ème} et 4^{ème} doigt. Les 2^{ème} et 5^{ème} doigts sont souvent réduits. Présence d'une barre post-orbital.

Famille : Bovidae (Bovidés)

Mammifères ruminants et herbivores. Estomac à 4 poches adapté à la rumination. Sabot à 2 doigts. Deux cornes frontales persistantes et creuses. Absence d'incisives sur le maxillaire supérieur et absence des canines. Regroupe les caprinés, antilopes et bovins. 135 espèces en 45 genres.

Sous-famille : Bovinae (Bovinés ou Bovins)

Comprend des animaux de taille moyenne à importante. L'existence de cette sous-famille au sein des Bovidae est supportée par des données génétiques (Matthee et Davis 2001). Genres : Bos, Bison, Boscaphalus, Bubalus, Syncerus, Taurotragus, Tetracerus, Tragelaphus.

Genre : Bos

Regroupe les bovins sauvages et domestiques. Plusieurs espèces : *Bos primigenius* (Aurochs), *Bos taurus* (Vache domestique), *Bos indicus* (Zébu), *Bos frontalis* (Gaur et Gayal), *Bos javanicus* (Banteng), *Bos sauveli* (Kouprey), *Bos grunniens* (Yak).

Cette classification des bovins est sujette à débat et controverse, notamment en ce qui concerne les séparations d'espèces du genre *Bos*, et même certaines séparations de genres dans la sous-famille des Bovinae.

En effet, une espèce est définie comme étant un groupe d'animaux interfertiles dont les descendant hybrides sont eux-mêmes féconds. Or, les « espèces » du genre *Bos* sont interfertiles ainsi que leurs descendants, ce qui remet en question la notion d'espèce dans ce genre (Verkaar *et al* 2004). Au sein de la sous-famille Bovinae, certains genres sont également interféconds, comme *Bos* et *Bison*. La séparation genres/espèces est donc aujourd'hui sujette à discussion, et de nombreuses études au niveau génétique sont menées afin de trancher sur la question.

Quoiqu'il en soit, les bovins représentent un groupe d'animaux extrêmement importants dans le monde entier. Leur domestication a été un tournant majeur dans l'Histoire de l'Humanité, ainsi que dans l'évolution des bovins (Diamond 2002). Où, quand et comment cette domestication s'est produite ? Quelles en sont les conséquences ?

I.1 Les foyers de domestication

Les bovins actuels dérivent des aurochs présents sur le Vieux Monde et éteints aujourd'hui (Loftus *et al* 1994). Ainsi, 3 races continentales ont pu être identifiées à partir d'ossements : *B. primigenius namadicus* (Asie), *B. primigenius opisthonomus* (Afrique du Nord), et *B. primigenius primigenius* (Europe). De plus, la population d'aurochs au travers de l'Europe était variée, comme le montrent les divergences nucléotidiques (Beja-Pereira *et al* 2006). Cette population d'aurochs a connu une expansion radiale lors de la dernière période glaciaire, entre 10 000 et 30 000 ans, comme l'indique la répartition de différents haplotypes d'ADN mitochondrial typiques des aurochs (Edwards *et al* 2007).

La domestication des bovins est souvent interprétée comme étant la résultante d'un seul événement de domestication, ayant eu lieu dans le Croissant Fertile. Des études ont montré que bien que cet événement soit exact, il n'est pas unique puisque deux autres foyers ont été recensés, notamment en Inde et en Afrique du Nord.

I.1.1 Foyer du Croissant Fertile

La région du Croissant Fertile regroupe les pays actuels comme l'Irak, l'Iran, la Syrie, et le Sud-Est de la Turquie. Les peuples nomades de chasseurs-cueilleurs deviennent des fermiers sédentaires en domestiquant plantes et animaux il y a environ 10 000 ans, durant le Néolithique. Les données archéologiques montrent que des espèces d'aurochs locales (*Bos primigenius primigenius*) sont domestiquées à cette période et vont former la lignée de bovins connus sous le nom d'espèce *Bos taurus*. Ces données sont confirmées par des résultats expérimentaux en génétique (répartition d'haplotypes d'ADN mitochondrial) à partir d'ossements anciens et de bovins actuels (Loftus *et al* 1994, Edwards *et al* 2007).

I.1.2 Foyer de l'Inde

Les données archéologiques montrent la présence de l'auroch asiatique, *Bos primigenius namadicus*, dans des régions de l'Afghanistan-Pakistan il y a 7000 ans. Des analyses de l'ADN mitochondrial, de micro-satellites et d'haplotypes du chromosome Y, montrent une divergence des lignées ayant engendré *Bos taurus* et *Bos indicus* datant d'une époque pré-domestique d'il y a 300 000 à 600 000 ans (Loftus *et al* 1994, MacHugh *et al* 1997). La lignée des *Bos indicus* serait donc la résultante d'un événement de domestication datant de 7000 ans à partir de *Bos primigenius namadicus*.

I.1.3 Foyer Nord-Africain

A l'heure actuelle, les zébus *Bos indicus* dominent l'Afrique. Pourtant, au néolithique, ce sont les *Bos taurus* qui sont présents en Afrique. Les *Bos indicus* seraient venus en Afrique plus tard, sous l'impulsion des migrations humaines.

L'étude de Bradley *et al* (1996) montre que les lignées de *Bos taurus* européennes et africaines possèdent chacune un ADN mitochondrial divergent. Cela montre une séparation pré-domestique des lignées *Bos taurus* européennes et africaines, consolidée par l'étude des micro-satellites de MacHugh *et al* (1997). L'hypothèse d'un événement de domestication indépendant en Afrique il y a 10 000 ans à partir de l'auroch local *Bos primigenius opisthonomus* est ainsi consolidée, notamment par des données plus récentes de séquences d'ADN mitochondrial (Beja-Pereira *et al* 2006). La séparation des deux lignées (*Bos primigenius primigenius* et *Bos primigenius opisthonomus*) a été estimée à 22 000 ans.

I.1.4 Autres foyers

Des données archéologiques et génétiques suggèrent que les yaks ont été domestiqués dans l'Himalaya il y a 4 500 ans ; les buffles d'Asie dans la vallée de l'Indus il y a 5 000 ans et en Chine il y a 7 000 ans ; le mithan dans la vallée de l'Indus il y a 4 500 ans (Finlay *et al* 2007).

I.2 Influences d'*Homo sapiens* sur les lignées *Bos taurus* et *Bos indicus*

I.2.1 Bovins africains

Des études portant sur l'ADN mitochondrial ont montré une nette séparation entre les lignées de *Bos indicus* indiens d'une part, et de *Bos taurus* européens et les *Bos indicus* africains d'autre part (Loftus *et al* 1994, Bradley *et al* 1996). Les analyses des haplotypes du chromosome Y montrent une séparation entre les lignées de *Bos taurus* européens d'une part, et les *Bos indicus* indiens et africains d'autre part (MacHugh *et al* 1997). Cette distribution asymétrique des génotypes a été interprétée comme étant la résultante de croisements entre mâles *Bos indicus* et femelles *Bos taurus* en Afrique, l'ADN mitochondrial se transmettant uniquement par les femelles et le chromosome Y par les mâles. De tels croisements auraient été effectués par les Arabes à partir du VII^{ème} siècle, ceux-ci apportant leurs races de *Bos indicus* avec eux lors de l'invasion de l'Afrique. Ces croisements auraient permis de générer des hybrides résistants aux climats arides, se répandant ensuite sur ce continent. La proportion d'allèles *Bos indicus* dans ces hybrides est variable selon les espèces. Certaines zones subtropicales possèdent encore une population *Bos taurus*, celle-ci étant plus résistante aux trypanosomes. La répartition des haplotypes d'ADN mitochondrial supporte cette hypothèse (Beja-Pereira *et al* 2006).

I.2.2 Bovins européens

Les données archéologiques montrent que les populations humaines migrent vers l'Europe et apportent avec elles leurs bovins selon deux chemins : l'un vers le Nord, suivant le Danube, et l'autre le long des côtes Méditerranéennes (Cymbron *et al* 2005). Les études génétiques montrent que les races bovines Méditerranéennes ont moins de variabilité génétique que les races d'Europe du Nord et Centrale, ce qui est concordant avec les données archéologiques.

L'influence de *Bos indicus* est plus importante dans les races Méditerranéennes que dans les races d'Europe du Nord. Cela s'explique par le fait que le Bassin Méditerranéen était occupé durant l'Antiquité par des civilisations pratiquant le commerce « international », comme la Grèce ou l'Empire Romain, contrairement au reste de l'Europe, plus isolé.

Des allèles de *Bos taurus* africains ont été détectés dans les races portugaises, ce qui s'explique par l'occupation arabe de la péninsule ibérique durant le Moyen-Age. D'autre part des haplotypes d'ADN mitochondrial de races africaines ont été retrouvés dans les races ibériques (Beja-Pereira *et al* 2006).

Un gradient Nord-Sud d'haplotypes du chromosome Y a été détecté dans les races européennes (Gotherstrom *et al* 2005). Ce gradient confirme les voies de migration Danube / Méditerranée d'une part, et d'autre part, montre que les races bovines européennes ont été croisées avec des aurochs locaux. Ces hybridations animaux domestiques / sauvages sont retrouvées également chez les chiens et les cochons et montrent que la séparation entre espèces sauvages et domestiques n'est pas justifiée. La grande diversité des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité contrastant avec la faible diversité des ADN mitochondriaux, il a été suggéré que les croisements avaient lieu entre mâles sauvages et femelles domestiques (Vilà *et al* 2005). Cette pratique permettait en effet de contrôler les naissances, les femelles domestiques demeurant au sein du troupeau. D'une manière générale, ces croisements ont permis d'augmenter la diversité génétique des animaux d'élevage, et ainsi d'apporter des résistances aux différents environnements rencontrés en Europe. Ces données sont concordantes avec la répartition des haplotypes d'ADN mitochondriaux (Beja-Pereira *et al* 2006, Edwards *et al* 2007).

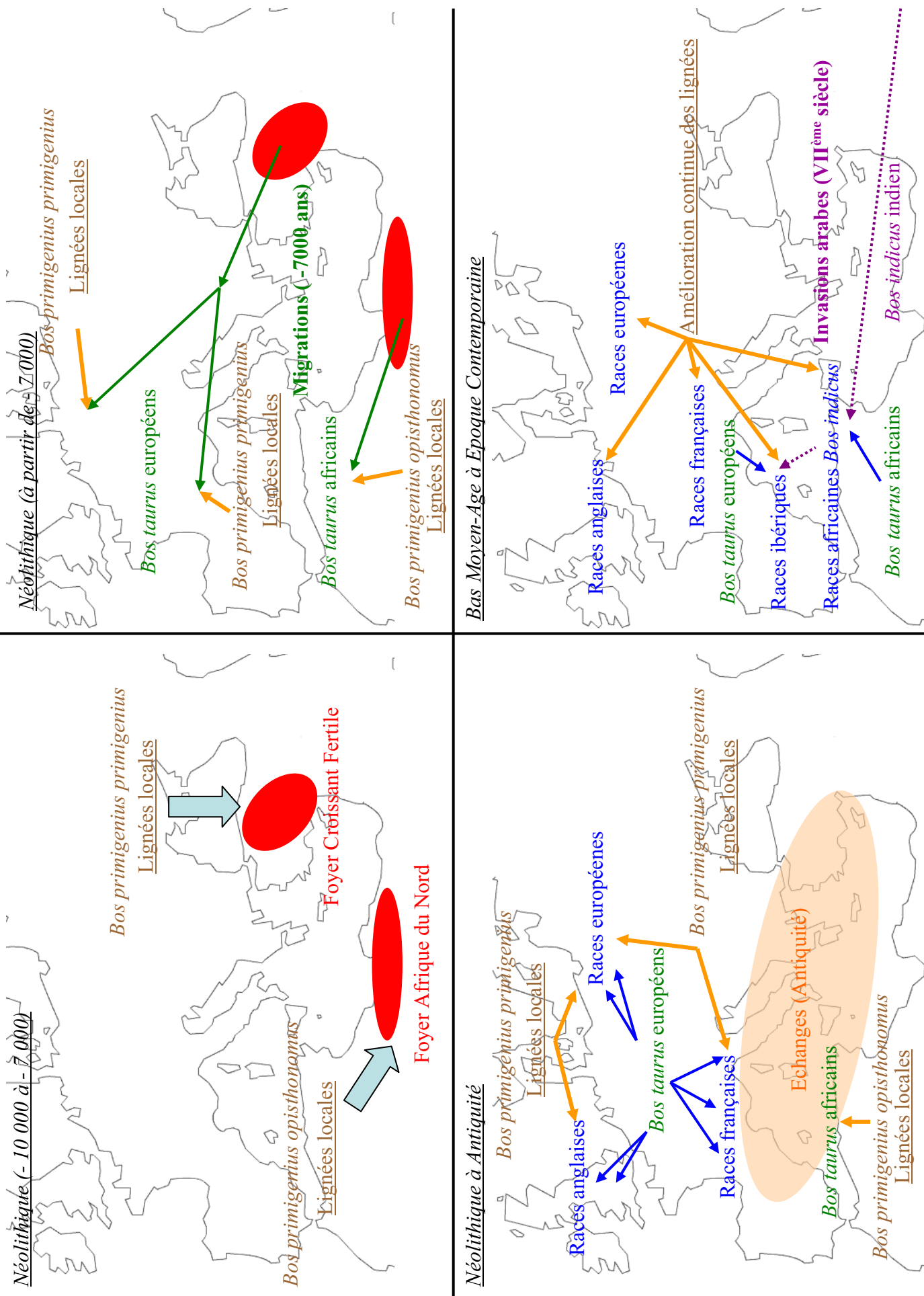
Une carte de synthèse (Figure 1) et un arbre de l'évolution des bovins *Bos primigenius* / *taurus* / *indicus* (Figure 2) résument ces données.

I.3 Conséquences pour *Homo sapiens*

I.3.1 Civilisation

La domestication des plantes et des animaux apporte un énorme avantage aux peuples (Diamond 2002). En effet, cela permet le développement de technologies telles que l'utilisation de métaux ou l'écriture. Car la domestication apporte la sédentarité, et permet de fonder les premières communautés, villes et empires, contrairement aux sociétés de cueilleur-chasseurs. La production de nourriture permet l'augmentation de la population. En conséquence, celle-ci migre et sort de sa région d'origine.

Figure 1. Histoire et migration des bovins sous influence humaine depuis le Néolithique



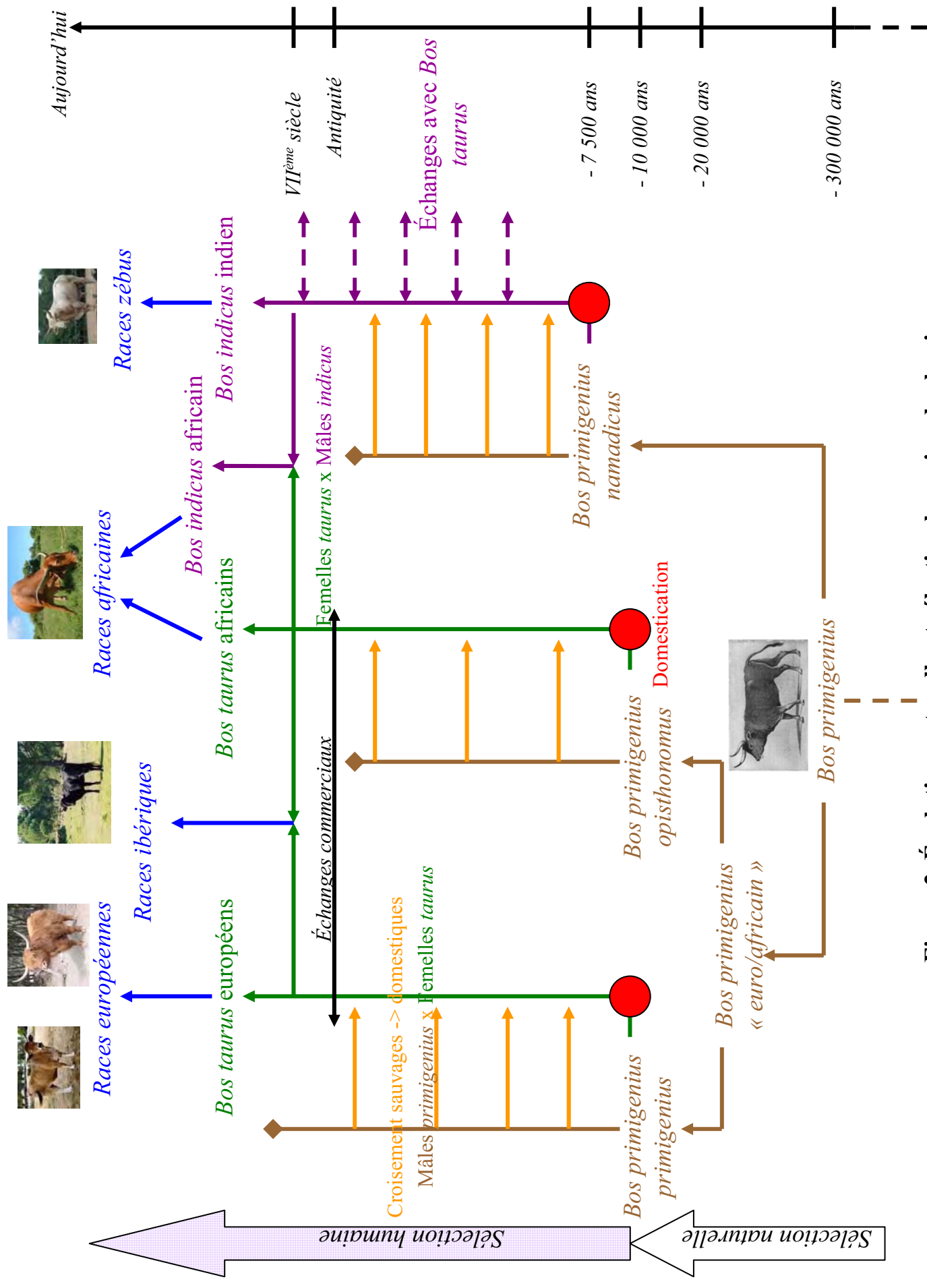


Figure 2. Évolution naturelle et sélection humaine des bovins

C'est ainsi que les populations de fermiers chassent et supplantent les populations locales de cueilleur-chasseurs. Les populations du Croissant Fertile, dites « Indo-européennes » s'établissent durablement en Europe. C'est la raison pour laquelle l'Europe est dominée par les langues indo-européennes.

I.3.2 Génétique et physiologie

La proximité avec le bétail apporte son lot de maladies qui se transmettent beaucoup plus facilement d'animal à humain, telle que la rougeole, la variole et la tuberculose, provenant des bovins, la grippe, venant des porcs et des canards. En conséquences, le génome humain évolue par sélection afin d'apporter un système immunitaire plus performant contre ces maladies.

Un autre exemple de conséquence biologique sur *Homo sapiens* est la persistance de l'expression de la lactase chez l'adulte. En effet, cette enzyme hydrolyse le lactose du lait et est exprimée chez l'enfant. Son expression s'arrête normalement chez l'adulte, ce qui est le cas dans les populations ne consommant pas de lait. Mais dans les populations productrices et consommatrices de produits laitiers, cette protéine continue d'être exprimée chez une majorité d'adultes. Cette persistance est due à des mutations au niveau des éléments régulateurs de l'expression du gène de la lactase (Ingram *et al* 2009). Ces mutations montrent un polymorphisme important dans les populations humaines consommatrices de produits laitiers et constitue un argument de poids pour démontrer un exemple d'évolution et de sélection naturelle récente (il y a environ 9000 ans) chez *Homo sapiens*.

I.3.3 Mythologie

Durant la préhistoire, l'aurochs symbolise un animal puissant et fabuleux (certains individus mesuraient 2 mètres au garrot pour un poids d'une tonne), comme l'illustrent les peintures de la grotte de Lascaux (Figure 3A). Durant l'Antiquité, les relations entre les bovins et la mythologie sont nombreuses. Zeus, ayant séduit Io, une prêtresse de sa femme Héra, s'attire les foudres de cette dernière. Afin d'éviter sa colère, Zeus transforme Io en génisse blanche, qui subira diverses épreuves d'Héra, notamment de faire le tour d'une mer qui porte aujourd'hui son nom (la mer Ionienne), et de traverser un détroit qui s'appelle aujourd'hui le Bosphore, ou « passage de la vache ». A la fin de son périple en Egypte, elle met au monde le fils de Zeus dont la descendance donnera les grandes lignées royales égyptiennes.

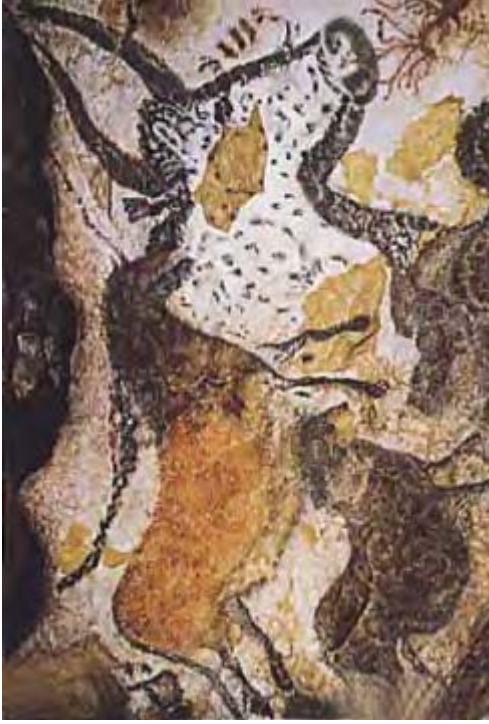


Figure 3A. L'auroch de Lascaux



Figure 3B. L'enlèvement d'Europe par Zeus en taureau



Figure 3C. Une vache sacrée en Inde



Figure 3D. Deux vaches célèbres représentant leurs produits

Toujours en quête de nouvelles aventures, Zeus séduit une princesse, Europe, et l'enlève en étant déguisé sous la forme d'un taureau blanc (Figure 3B). Leur descendance donnera la lignée des rois de Crète, dont le symbole est une vache. Quelques temps plus tard, la femme du roi de Crète Minos, ayant trompé son mari avec un taureau, donne naissance au Minotaure, monstre mi-homme, mi-taureau, enfermé dans le labyrinthe et qui sera tué par Thésée.

Aujourd'hui, d'autres croyances ou symboles sont toujours présents. Ainsi, comment ne pas penser à la vache sacrée indienne (Figure 3C) ? Pour certains peuples d'Afrique, comme les Massaïs, les bovins sont leur seule richesse et une source de nourriture importante au travers de leur lait et leur sang. Il faut également citer la tauromachie (duel entre un homme et un animal puissant, le taureau), les cow-boys (l'homme libre et fort élevant son troupeau), l'image de la maternité de la vache et de la virilité des taureaux. Certaines sociétés sont symbolisées par des vaches désormais célèbres afin de donner une image de sympathie, de bonne humeur et de convivialité à leurs produits (Figure 3D).

Le langage n'y fait pas exception puisque les bovins font partie de nombreuses expressions de la langue française, comme « il pleut à vache qui pisse », « parler anglais comme une vache espagnole », « un petit bœuf entre amis », ou « pleurer comme un veau » et bien d'autres encore.

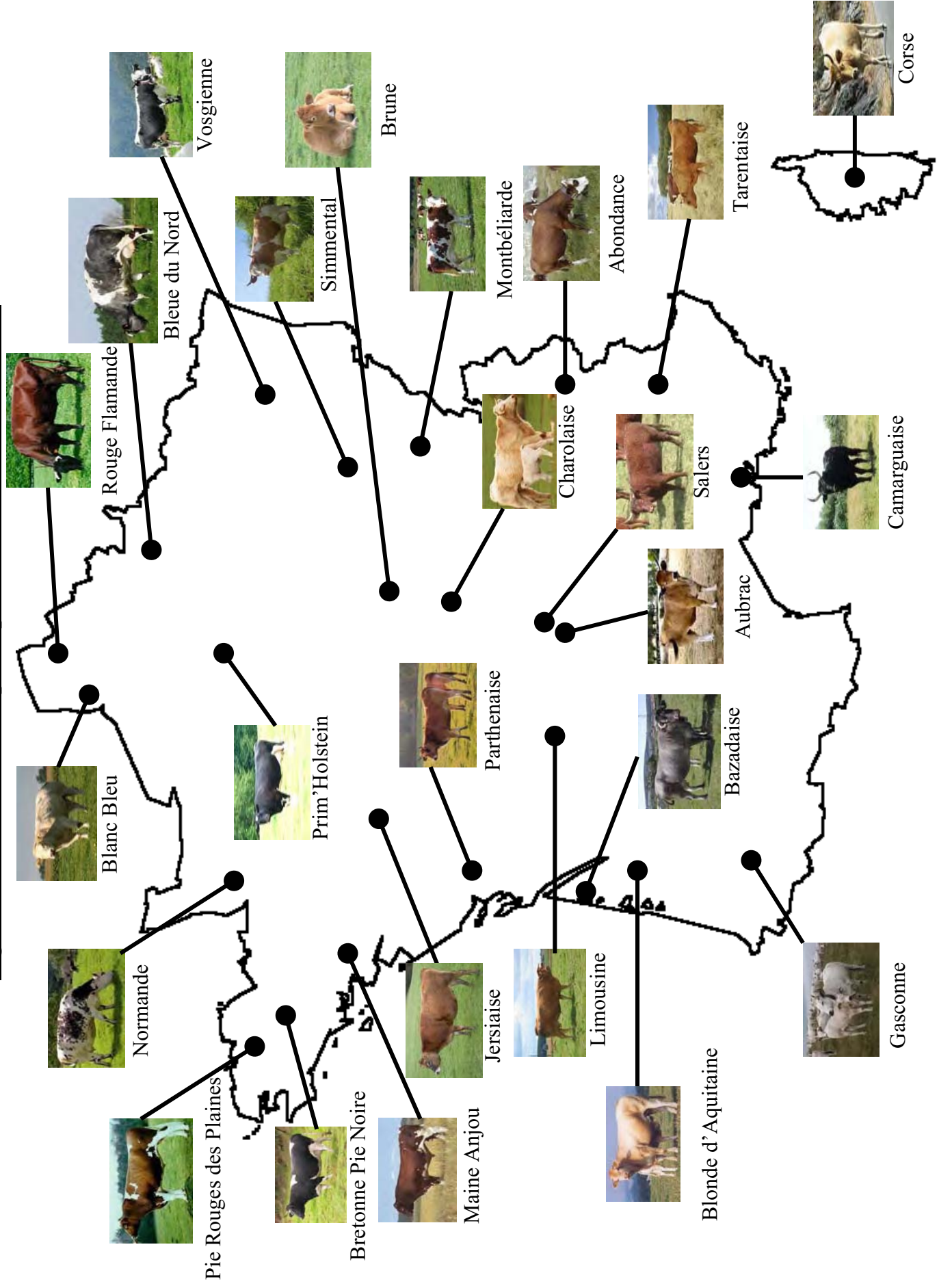
Les bovins ont donc exercé une grande influence spirituelle sur *Homo sapiens*, qui se poursuit aujourd'hui.

I.4 Les différentes races bovines et l'exception française

Avec le cheptel bovin le plus important au niveau européen, composé par plus de 25 races différentes, la France est un cas particulier là où les autres pays n'exploitent commercialement que quelques races. C'est la résultante de l'implantation de bovins dans des territoires différents par leurs sols, leur altitude, et leur climat (Figure 4). Les races françaises sont classées en fonction de leur type de production (Figure 5) :

- Les races à viande, spécialisées dans la production de viande. Deux catégories sont différenciées : les traditionnelles comme la Charolaise, la Limousine et la Blonde d'Aquitaine, et les rustiques comme la Salers et l'Aubrac.
- Les races laitières, spécialisées dans la production de lait, comme la Prim'Holstein.
- Les races mixtes, produisant à la fois du lait et de la viande, comme la Normande et la Montbéliarde.

Figure 4. Localisation des principales races bovines françaises



Races à viande

Races traditionnelles



Charolaise



Blonde d'Aquitaine



Limousine

Races rustiques



Aubrac



Salers



Gasconne

Races laitières



Prim'Holstein



Jersiaise



Bretonne Pie Noire

Races mixtes



Normande



Montbéliarde



Tarentaise

Figure 5. Quelques races bovines françaises

La grande diversité des races françaises est maintenue car les produits du terroir nécessitent des races locales, en particulier pour la production de fromages régionaux. En effet, les races vont apporter une saveur particulière au lait qui va conférer au fromage sa caractéristique locale. En ce qui concerne la viande, les consommateurs demandent une production basée sur l'utilisation de races spécialisées et reconnues dans ce domaine. Là aussi, l'utilisation de races locales est appréciée. La traçabilité mise en place à la suite des crises sanitaires récentes permet aux consommateurs de sélectionner l'origine géographique et génétique de l'animal. Le choix est ainsi effectué en fonction de la race de l'animal. Les bouchers peuvent proposer à leurs clients une viande de Blonde d'Aquitaine ou de Limousine par exemple. C'est une liberté de choix grandement appréciée par le consommateur.

Contrairement à la France, un nombre restreint de race est exploité commercialement dans les autres pays du monde (Figure 6). Des races européennes ont été importées dans d'autres régions du monde comme les Amériques ou l'Australie. Afin d'optimiser les performances ou tout simplement la survie des bovins européens dans les régions tropicales, ces derniers ont été croisés avec des zébus. Par exemple, la race américaine Braford résulte du croisement entre la race de *Bos taurus* Hereford (performante mais peu résistante au climat de l'Ouest américain) et la race de *Bos indicus* Brahmane (peu de performances mais résistante au climat de l'Ouest). Ce type de race apparaît dans les années 40-50 et est très présent notamment aux Etats-Unis et en Australie. Le cheptel contient ainsi une part importante de *Bos indicus*, alors qu'il y a uniquement *Bos taurus* en France

Une différence importante existe entre le système d'élevage français et le système américain (Figure 7). En effet, les américains utilisent les « feed-lots », ou parcs d'engraissement. Le principe est d'engraisser un maximum de bétail dans un minimum d'espace en les nourrissant de manière intensive au maïs. Le rendement est alors maximal. Le problème de cette méthode est double : d'une part, la viande obtenue est très grasse, ce qui pose un problème sérieux de santé publique, et d'autre part, la manière même de produire n'est respectueuse ni de l'environnement, ni du bien-être animal. C'est grâce à ce système que les Etats-Unis parviennent à produire leur viande bovine, les ranchs traditionnels n'étant réservés qu'à l'élevage des reproducteurs.

La France, quant à elle, pratique un élevage où le bien-être animal et la qualité de la production sont des critères importants. En conséquence, le système d'élevage est très différent des « feed-lots » américains mais également plus diversifié. Dans certains élevages,



Highland (Ecosse)



Blanc Bleu Belge (Belgique)



Avilena (Espagne)



Hereford (Angleterre)



Angus (Angleterre)



Islandaise (Scandinavie)



Braunvieh (Suisse)



Afrikaner (Afrique du Sud)



Brahmane (Inde)



Banteng (Indonésie)

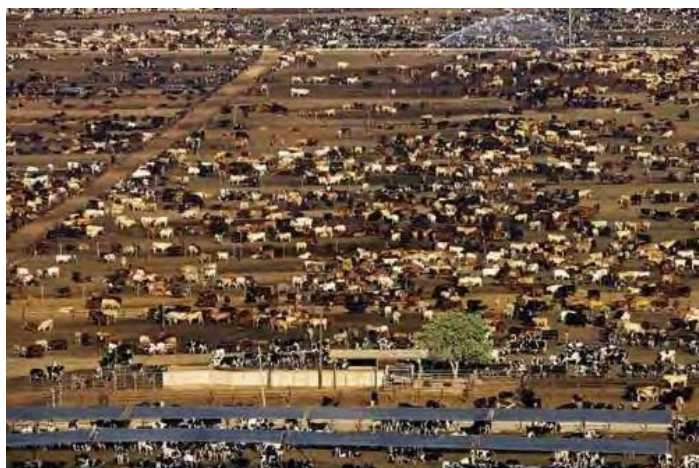


Wagyu (Japon)



Braford (USA)

Figure 6. Quelques races bovines étrangères



A



B

Figure 7. Différents systèmes d'élevage entre les Etats-Unis et la France

A : Système en « feed-lot » ou parc d'engraissement américain

B : Système en pâturage français

les animaux bénéficient d'une période de pâture leur permettant de s'engraisser à l'herbe, cette pratique étant encouragée par les consommateurs qui veulent une image de production de plus en plus naturelle. L'élevage en stabulation en France n'est pas aussi intensif qu'aux Etats-Unis. Plusieurs sortes de nourriture peuvent être distribuées aux bovins : herbe, luzerne, foin, ensilage de maïs, paille, graines de blé, tourteau de soja...

Une autre exception de la France est la diversité des types d'animaux produits et consommés, comme les vaches, bœufs, taurillons, veaux et taureaux, tandis que les autres pays privilégient plutôt un type d'animal (Micol et Lherm 2010). Les critères de qualités sont également différents puisqu'en France, la viande maigre est appréciée tandis qu'au Japon, en Australie et aux Etats-Unis, les consommateurs préfèrent une viande grasse dite persillée.

Ce sont toutes ces différences qui font de la France un pays particulier quant à la production (1 725 milliers de tec en 2008, premier rang européen) et la consommation (1 643 milliers de tec en 2008, premier rang européen) de viande bovine.

II Le muscle squelettique strié

Le muscle squelettique strié représente près de la moitié de la masse corporelle, représentant ainsi le tissu le plus abondant du corps humain (Grefte *et al* 2007). Recouvrant le squelette osseux, il y est rattaché par le biais des tendons. Il permet ainsi le maintien de la posture et les mouvements du corps. Ses contractions sont volontaires, répondant aux influx nerveux. Le muscle est composé de 75 % d'eau, 20 % de protéines, 3 % de lipides, 1 % de glucides et 1 % de sels minéraux.

Le muscle squelettique strié est l'objet de nombreuses études, en particulier dans le cas de maladies chez l'humain. De nombreuses données sont ainsi disponibles, mais malgré cela le muscle est une structure encore loin d'être parfaitement connue. Le muscle constitue la chair des animaux, et chez les espèces d'intérêt agronomique, il est transformé en viande lors de la maturation. C'est pourquoi il est également l'objet de nombreuses études en agronomie, aussi bien chez les poissons que les poulets, porcs et bovins.

II.1 Structures et fonctions

Le muscle squelettique strié est une structure biologique très complexe (Harper 1999) et hiérarchisée (Figure 8). Ainsi, il est principalement composé de faisceaux de fibres musculaires, qui sont des cellules pluri-nuclées. Chaque fibre musculaire est elle-même constituée de myofibrilles, ultrastructures organisées en répétitions de sarcomères. Ces répétitions donnent au muscle ce caractère strié. Les sarcomères, unités de contraction du muscle, sont des assemblages des filaments d'actine et de myosine.

L'étude détaillée du muscle montre que la structure de ce dernier est constituée de plusieurs niveaux, délimités par des couches de tissu conjonctif constitués essentiellement de collagènes et de protéoglycanes (Figure 9). Chaque fibre musculaire est entourée par une enveloppe, l'endomysium. Les faisceaux de fibres sont délimités par le perimysium, contenant des lipides intramusculaires et le système vasculaire. Le perimysium et l'endomysium forment le tissu conjonctif intramusculaire, dont le perimysium est le constituant principal. Enfin, le muscle est gainé par l'epimysium, enveloppe qui attache le muscle à l'os par le tendon. Les différentes enveloppes de tissu conjonctif ont un rôle moteur important, en transmettant l'énergie mécanique de la contraction de chaque fibre musculaire au muscle dans son ensemble, et ainsi permettre le mouvement des os. De plus, chaque fibre est innervée, et les nutriments sont apportés par des vaisseaux sanguins.

Le rôle premier du muscle squelettique strié est d'assurer les mouvements volontaires du corps, par contraction / décontraction de sa structure, entraînant le mouvement des os. Il permet ainsi la locomotion de l'organisme. Des dysfonctionnements et des dégénérescences musculaires sont la cause de myopathies, entraînant le plus souvent des défauts graves de locomotion, et parfois la mort.

Le muscle est également un thermorégulateur de l'organisme, puisque la contraction musculaire permet de produire de la chaleur. Ainsi, en cas de froid, l'organisme « frissonne » ; c'est-à-dire qu'il contracte et décontracte les muscles afin de réchauffer l'organisme, et de diffuser cette chaleur via les vaisseaux sanguins. Enfin, le muscle constitue une réserve de protéine importante, dégradée en cas de privation de nourriture.

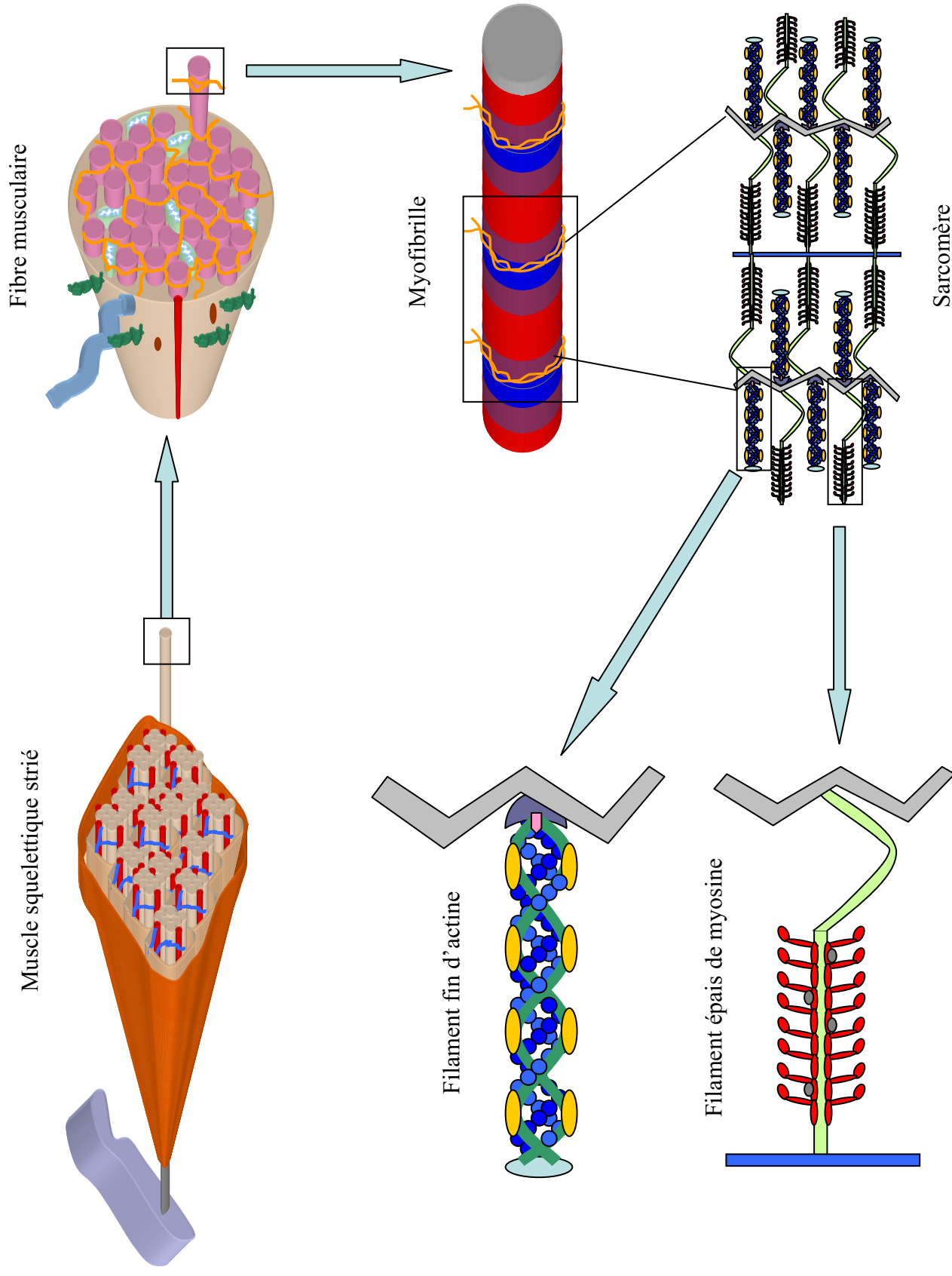


Figure 8. Organisation hiérarchique du muscle squelettique strié

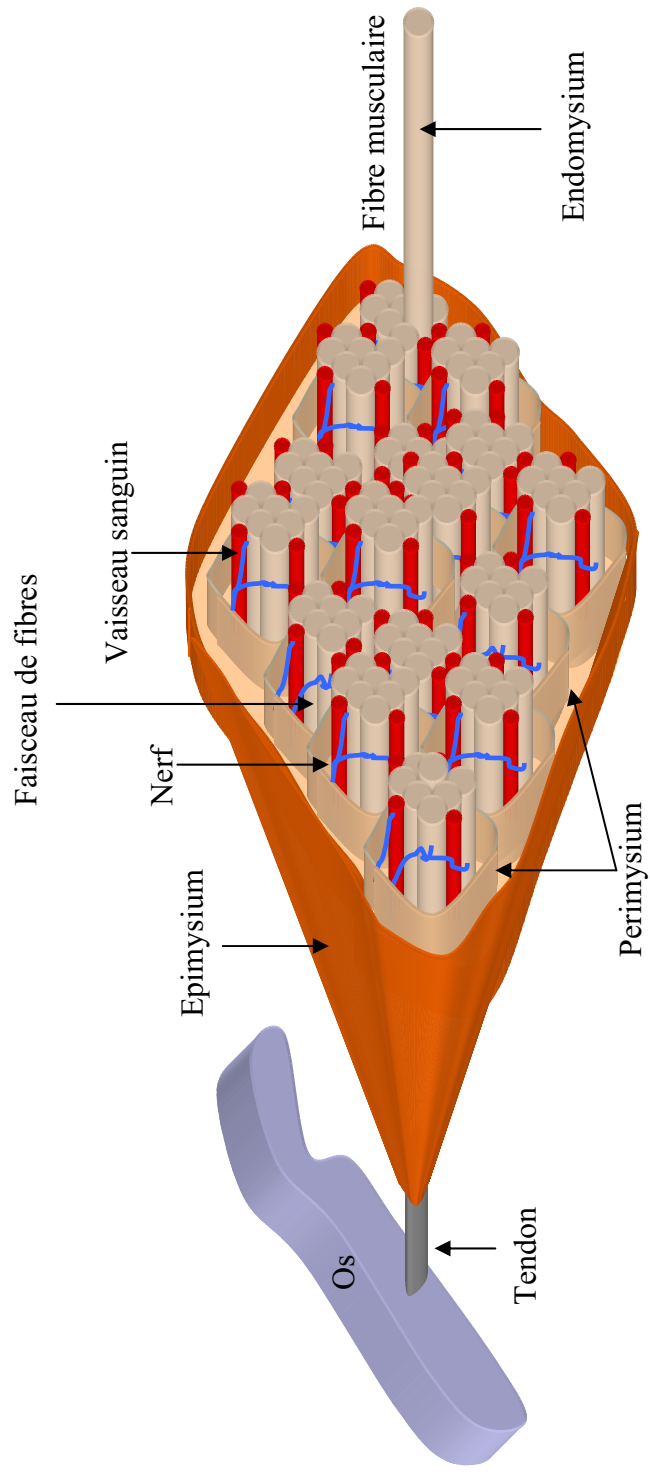


Figure 9. Le muscle squelettique strié

II.1.1 Les fibres

La fibre musculaire, cellule plurinucléée pouvant mesurer une trentaine de centimètres de long, est une composante principale du muscle. A l'instar de celui-ci, sa structure est hiérarchisée (Figure 10).

L'élément contractile des fibres musculaires est la myofibrille. Les myofibrilles sont regroupées en faisceaux au sein de la fibre. Elles occupent 80% du volume de la cellule. Leur cohésion est assurée par des complexes protéiques, les costamères. Les myofibrilles sont également liées à la membrane plasmique de la fibre, le sarcolemme, par les mêmes structures. Les espaces laissés par les myofibrilles sont occupés par le réticulum sarcoplasmique, ou tubule T. Ce réticulum sarcoplasmique, ou sarcoplasme, est majoritairement constitué d'eau (75 à 85 %). Il contient notamment du glycogène, de la phosphocréatine, des acides gras, de la myoglobine, et des mitochondries. Chaque fibre est alimentée par un vaisseau sanguin, et innervée, la jonction entre le nerf et le sarcolemme formant la plaque motrice. La cohésion des fibres est assurée par leur matrice extracellulaire, formant l'endomysium.

Les premières classifications des fibres sont basées sur les propriétés contractiles de ces dernières.

Les fibres ont donc été classées en fonction de l'activité ATPasique myofibrillaire (mATPase), après incubations des fibres en pH acide ou basique (Brooke et Kaiser 1970). L'activité mATPase permet de déterminer la vitesse de contraction des fibres. Cela a permis de distinguer les fibres de type I à contraction lente, dont l'activité mATPase est inhibée après incubation dans un pH basique. Les fibres de type II, à contraction rapide, ont une activité mATPase inhibée après incubation dans des pH acides. Pour les fibres de type II, initialement 2 sous-types ont pu être identifiés par incubations en différents pH acides. En effet, l'activité des fibres IIA est inhibée à pH=4,9 et celle des fibres IIB à pH=4,3.

Une autre classification fait intervenir, en plus de l'activité mATPase, l'activité de l'enzyme du métabolisme oxydatif Succinate DéHydrogenase (Peter *et al* 1972). Cela a permis la distinction des fibres lentes oxydatives (SO), rapides oxydo-glycolytiques (FOG), et rapides glycolytiques (FG).

Une troisième classification tient compte de la couleur en plus de ces critères (Ashmore et Doerr 1971) et différencie les fibres β R (mATPase acido-résistante, oxydative rouge), α R

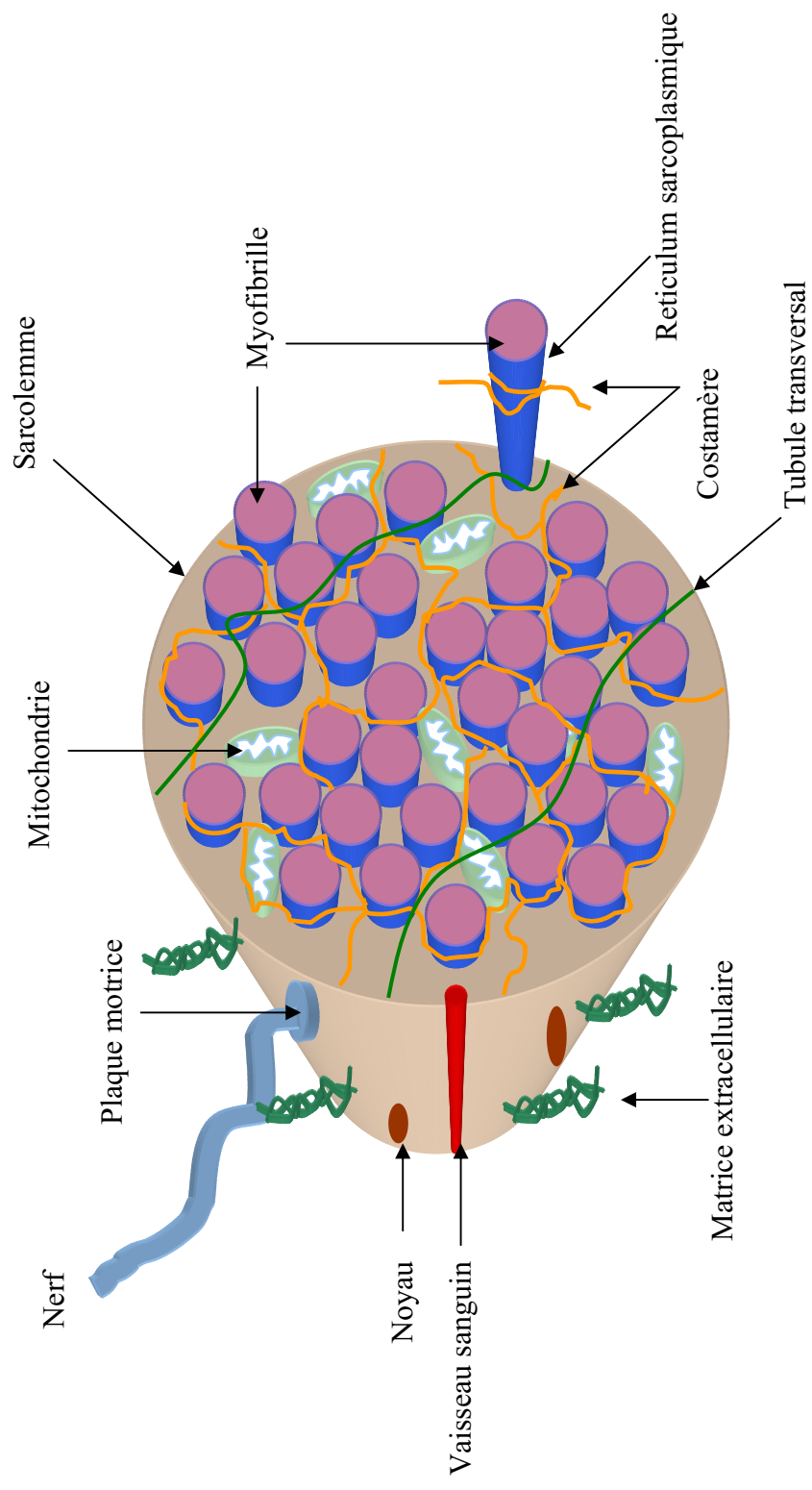


Figure 10. La fibre musculaire

(mATPase acido-labile, oxydo-glycolytique rouge) et α W (mATPase acido-labile, glycolytique blanche).

Ces trois classifications sont équivalentes (Tableau 1). Mais des divergences existent, et ont suggéré des variations dans la composition des molécules de myosine au sein d'un même type de fibre, autrement dit l'existence de sous-types.

La myosine est la protéine prédominante des fibres musculaires (1/3 des protéines). Elle est formée de quatre chaînes légères (MLC) et de deux chaînes lourdes (MyHC) (Picard *et al* 2002). Différentes isoformes de ces chaînes lourdes existent et peuvent être assemblées dans un filament de myosine. La tête des chaînes lourdes porte l'activité ATPase Ca^{2+} -dépendante spécifique de l'actine. Les propriétés contractiles d'une fibre vont donc découler de sa composition en différentes isoformes de chaîne lourde de myosine. Les divergences apparues avec les classifications exposées précédemment s'expliquent par les compositions nuancées des fibres en différentes isoformes de chaîne lourde de myosine, et donc des propriétés métaboliques plus contrastées entre types de fibre. Une classification immuno-histochimique, utilisant des anticorps spécifiques des différentes isoformes des chaînes lourde de myosine, a été utilisée chez le bovin (Picard *et al* 1998).

Ainsi, chez les mammifères, les fibres à contraction lente (type I) sont constituées de MyHC de type I. De même, les fibres IIA sont composées de MyHC IIA, les fibres IIB de chaînes IIB. Un autre type de MyHC a été identifié, l'isoforme IIX, qui compose les fibres IIX. Ces fibres ont des propriétés intermédiaires entre les fibres IIA et IIB, et étaient confondues avec les fibres IIB par les classifications précédentes. Les fibres I, IIA, IIX et IIB, qui ne contiennent qu'une isoforme de myosine, sont dites « pures ». Des fibres dites « hybrides » sont composées de plusieurs isoformes différentes de myosine, et montrent des propriétés intermédiaires avec les fibres pures, ce qui rend les classifications peu tranchées. Leur dénomination renseigne sur la proportion relative d'isoformes de chaîne lourde qui composent les fibres hybrides. Ainsi, les fibres IIAX contiennent autant d'isoformes IIA que IIX, les fibres IIAX sont formées majoritairement d'isoformes IIA que IIX.

Les différentes isoformes de chaînes lourdes de myosine sont chacune codées par un seul gène. Ainsi, 10 gènes d'isoforme de MyHC ont été identifiés chez les mammifères, contre une trentaine chez les oiseaux et un seul chez la drosophile. Les gènes d'isoformes rapides sont plus proches entre différentes espèces qu'avec les gènes d'isoformes lentes d'une même espèce.

Types de fibre			
	I β R (rouge) SO	IIA α R (rouge) FOG	IIB α W (blanche) FG
Physiologie			
Vitesse de contraction	Lente	Rapide	Rapide
Résistance à la fatigue	+++	++	+
Morphologie			
Couleur	Rouge	Rouge	Blanche
Myoglobine	+++	+++	+
Nombre de mitochondries	+++	+++	+
Diamètre	+	+++	+++
Métabolites			
Glycogène	+	+++	+++
Lipides	+++	+++	+
Propriétés enzymatiques			
mATPase	+	+++	+++
Enzymes glycolytiques	+	++	+++
Enzymes oxydatives	+++	++	+

Tableau 1. Classifications et propriétés des fibres

Adapté de Picard *et al*, 2002.

Le bovin possède les isoformes rapides de MyHC IIa et IIX (Chikuni *et al* 2004). Le génome bovin contient le gène de l'isoforme MyHC IIB, qui est transcrit en ARN, mais non traduit en protéine, excepté pour quelques rares individus (Picard et Cassar-Malek 2009). Les anciennes classifications confondant fibres IIB et IIX, de nombreux articles sur les fibres musculaires bovines font état de fibres IIB au lieu de fibres IIX.

D'autres isoformes de chaînes lourdes de myosine existent, et sont exprimées soit durant la vie fœtale, soit dans des muscles très spécialisés (comme l'isoforme α -cardiaque).

La taille des fibres est également différente en fonction du métabolisme glycolytique ou oxydatif. Les fibres oxydatives sont en effet plus petites que les fibres glycolytiques afin de faciliter la diffusion de l'oxygène dans la cellule (Maltin *et al* 2003).

Une corrélation négative existe entre la capacité oxydative d'une fibre et son diamètre. Ainsi, une fibre oxydative est plus petite qu'une fibre glycolytique. Cela favorise ainsi la diffusion de l'oxygène au sein de la cellule musculaire.

II.1.2 Les myofibrilles

Les myofibrilles sont caractérisées au microscope par une alternance de bandes claires et foncées, dont l'origine est expliquée par leur composition protéique (Figure 11). Ces bandes étant au même niveau pour toutes les myofibrilles d'une fibre, la cellule a un aspect strié caractéristique. Sous une lumière polarisée, les bandes sombres sont biréfringentes, d'où leur nom de bande anisotrope, ou bande A, et les bandes claires sont isotropes, les bandes I. La bande A présente en son milieu une zone plus claire, la bande H, elle-même divisée par une ligne sombre, la ligne M. La bande I est divisée en deux par le disque Z. Un sarcomère est compris entre deux disques Z.

Au microscope électronique, les myofibrilles apparaissent constituées de deux sortes de filaments : les filaments fins et épais. Les filaments épais, de 100 Å de diamètre, sont des filaments de myosine. Les filaments fins, de 50 Å de diamètre, sont les filaments d'actine. La bande I est constituée de filaments fins d'actine. La bande A est caractérisée par le chevauchement des filaments de myosine par les filaments d'actine. Le chevauchement des filaments fins ne portant pas sur toute la longueur des filaments épais, il existe une zone où les filaments de myosine sont seuls : c'est la bande H. Les structures protéiques maintenant les filaments épais forment la ligne M, au sein de la bande A. Les filaments fins d'actine sont reliés entre eux par une structure protéique, la ligne Z.

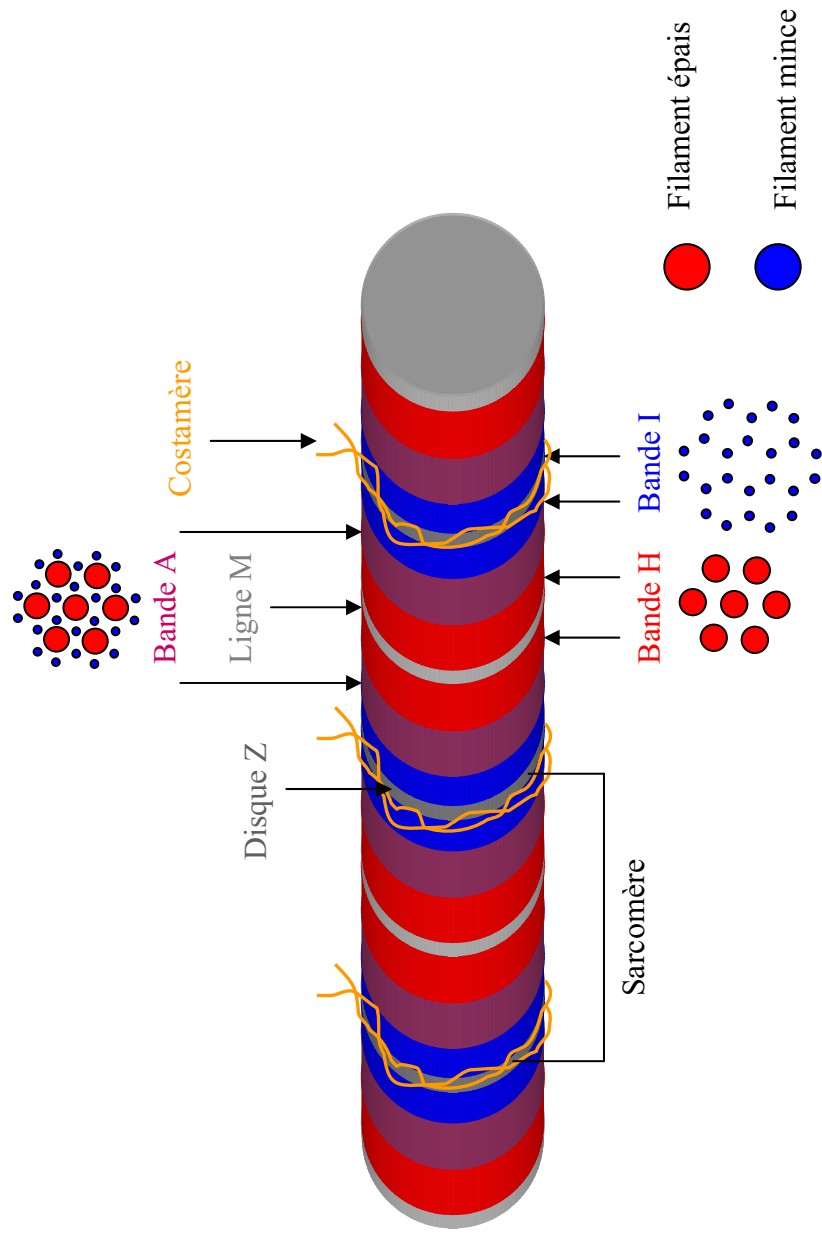


Figure 11. La myofibrille

La force de contraction produite par le raccourcissement des sarcomères est propagée au travers de la fibre grâce aux liaisons entre la myofibrille et la fibre.

II.1.3 Les sarcomères

Les sarcomères sont les unités contractiles répétées constituant une myofibrille (Figure 12). Un sarcomère est compris entre deux disques Z (structure d'attache des filaments d'actine). Il comprend donc deux moitiés de bande I (filaments d'actine), une bande A (filaments de myosine et d'actine), une zone H (filaments de myosine) et une ligne M (structure d'attache des filaments de myosine). Les caractéristiques des sarcomères sont modulées en fonction des différents types de muscle, en utilisant des isoformes de protéines contractiles diverses (Agarkova et Perriard 2005). Un sarcomère est donc constitué de filaments fins et épais et de leurs structures d'attache. C'est la plus petite unité contractile de la fibre musculaire.

II.1.4 Les costamères

Les costamères sont des complexes protéiques entourant les disques Z des myofibrilles, permettant leur alignement. Ils transmettent la force de contraction des sarcomères vers la matrice extracellulaire via le sarcolemme, et donc vers les autres fibres musculaires. De part leur positionnement le long des sarcomères, les costamères transmettent les forces latéralement, ce qui permet de maintenir une longueur uniforme entre les différentes cellules musculaires. Les costamères sont donc des zones soumises à un effort mécanique important.

Des protéines appartenant à la famille des filaments intermédiaires, comme la desmine, sont des constituants majeurs des costamères. L'intégrité du costamère est essentielle au bon fonctionnement du muscle. Des dysfonctionnements dans cette structure est liée à des dystrophies, comme par exemple la dystrophie musculaire de Duchenne. Ces maladies ont permis d'identifier des protéines constitutives des costamères, comme la dystrophine, dont le mauvais fonctionnement du gène est responsable de la myopathie de Duchenne. En effet, la dystrophine est directement impliquée dans la liaison entre le sarcolemme et le costamère.

Les protéines du costamère

Vinculine – Taline – α -actinine – β -intégrines - Desmine – Dystrophine – γ -actine – Dystrobrevine – Syntrophine – Dystroglycane – Filamine - Desmoline - Syncoiline

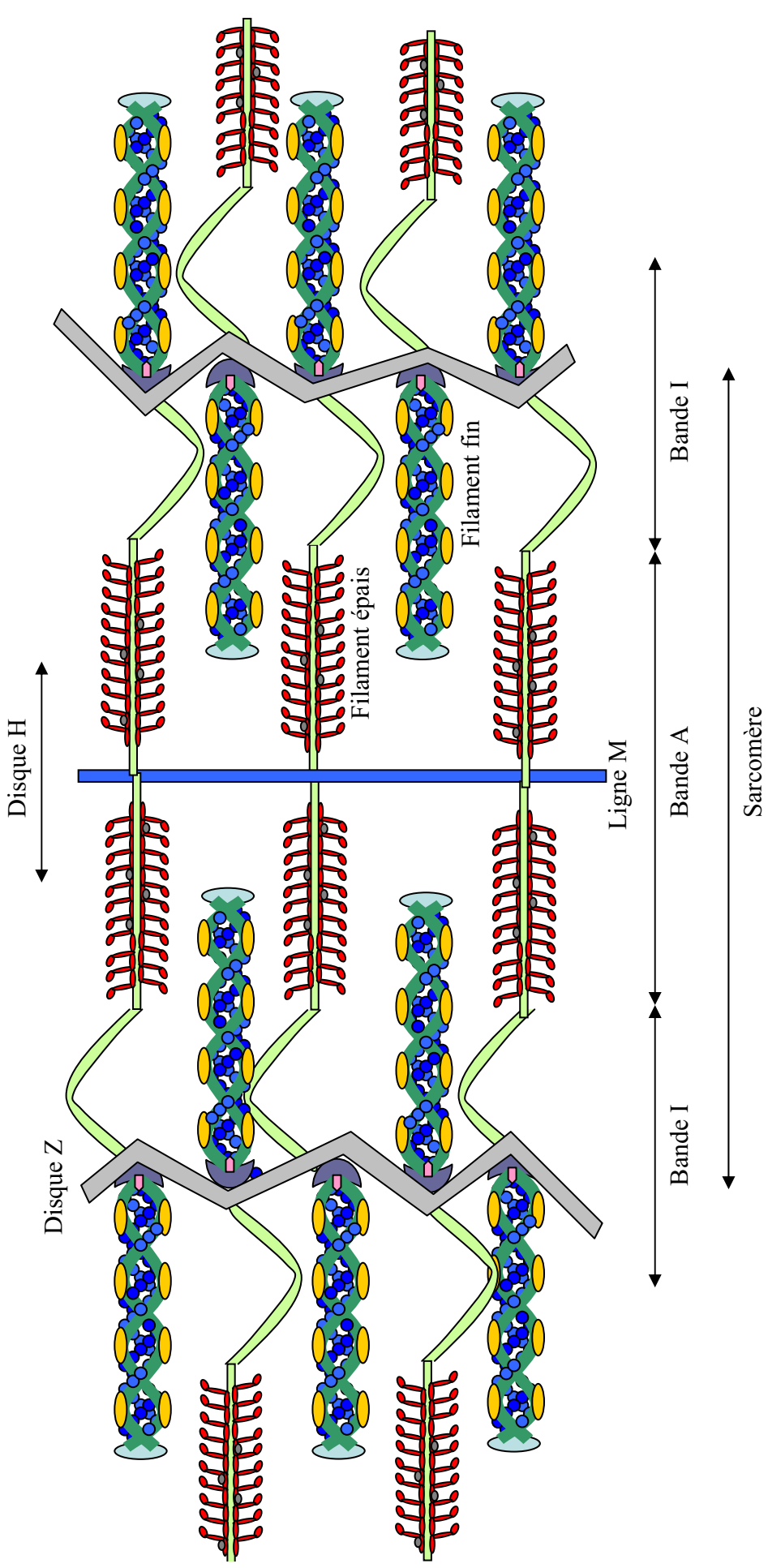


Figure 12. Le sarcomère

II.1.5 La ligne M

La ligne M forme une structure sombre et dense aux électrons au milieu de la bande A, qui coupe longitudinalement la myofibrille. C'est un élément important du cytosquelette du sarcomère. La ligne M apparaît formée d'un ensemble de lignes, dont le nombre varie selon le type de fibre (Lange *et al* 2005b). Ainsi, les fibres rapide contiennent les lignes M4, M1, M4', les fibres lentes M6, M4, M4', M6', et les fibres intermédiaires M6, M4, M1, M4', M6'.

La myomésine et la M-protéine sont des composantes structurales de la ligne M (Obermann *et al* 1996). La quantité de myomésine est la même dans tous les types de fibres, mais la quantité de M-protéine est plus importante dans les fibres rapides. Les lignes M sont des structures dynamiques dont la composition évolue en fonction de la spécialisation de la fibre et du muscle. Ceci permettrait de régler finement les propriétés élastiques de la ligne M.

La M-protéine constitue notamment la ligne M1 (Agarkova et Perriard 2005). La myomésine constitue quant à elle les lignes M4 et M4', et est associée avec la créatine kinase, enzyme métabolique dont la fonction est d'apporter de l'énergie aux muscles. Quant aux lignes M6 et M6', leur composition n'est pas encore connue. La myomésine et la M-protéine sont liées à la partie C-terminale de la titine.

Les lignes M1, M4, M4', M6 et M6' forment des lignes reliant les filaments épais de myosine, en se liant avec la titine d'une part, et avec la myosine d'autre part. Des filaments M, parallèles aux filaments épais, relient ces lignes entre elles. L'obscurine est impliquée dans la formation de la ligne M (Kontogianni-Konstantopoulos *et al* 2004) et dans son ancrage au reticulum sarcoplasmique via l'ankirine (Lange *et al* 2006). La protéine à doigts de zinc MURF-1, fixée sur la titine, est impliquée dans des fonctions cellulaires telles que la signalisation, l'ubiquitination, et la transcription (Clark *et al* 2002). La calpaïne 3 (ou p94), dont le rôle essentiel dans le muscle squelettique a été montré par études de mutants, serait fixé sur la titine.

D'autres enzymes métaboliques ont été localisées dans la ligne M, comme l'énolase, la phosphofructokinase, et l'adénylate kinase. Celles-ci se fixent sur la ligne M par l'intermédiaire de DRAL/FHL-2 (Lange *et al* 2005a).

La ligne M permet d'assurer une structure résistante aux efforts mécaniques et une répartition régulière des filaments épais, donc de maintenir l'intégrité du sarcomère

(Schoenauer *et al* 2005). En effet, la ligne M renforce le rôle stabilisateur de la titine, protéine qui parcourt la totalité du sarcomère en reliant le disque Z à la ligne M, et ramenant ces structures en position initiale après la contraction. La ligne M a un rôle analogue au disque Z. Des souris KO pour la myoméline ou la M-protéine n'ont pu être produites à l'heure actuelle, mais des KO conditionnels pour le domaine de la titine reconnaissant la ligne M ont été produites. L'activation du KO conduit à un désassemblage du sarcomère et à la mort de la souris, ce qui montre le caractère essentiel de la ligne M. La protéine MURF-1, fixée sur la titine, régule la dégradation des protéines musculaires et est impliquée dans la maintenance de la ligne M.

Les protéines de la ligne M

**Créatine kinase – Myoméline – M-protéine - Obscurine – Titine (partie C-terminale)
– DRAL/FHL-2 – Ankirine – MURF-1 – Calpaïne 3/p94**

II.1.6 Le disque Z

Le disque Z délimite un sarcomère et constitue le point d'ancrage des filaments fins d'actine et des filaments de titine (Clark *et al* 2002). C'est le disque Z qui transmet la force de contraction au reste de la fibre musculaire via les costamères. C'est cette structure qui permet également l'alignement et la synchronisation des myofibrilles. De plus, certains constituants du disque Z transmettent des signaux aux noyaux. Ce disque ne se réduit pas à son rôle de structure, mais possède également un rôle dans la signalisation. Un constituant majeur du disque Z est l' α -actinine, qui est comme l'ossature de ce disque.

Les protéines du disque Z

α -actinine – Spectrine – Myotiline – Myopalladine – γ -filamine – Téléthonine – Desmine – Titine (partie N-terminale)

II.1.7 Les filaments épais

Les filaments épais sont ancrés au disque Z et à la ligne M (Figure 13). Ils sont constitués principalement de centaines de molécules de myosine (Clark *et al* 2002). Chaque filament peut ainsi compter entre 200 et 400 molécules de myosine. La longueur des filaments est régulée par la titine. La partie N-terminale de cette grande protéine de 3000 kDa est fixée sur le disque Z et sa partie C-terminale sur la ligne M. Cela permet ainsi de maintenir l'alignement du sarcomère durant la contraction musculaire. Cette protéine est donc une

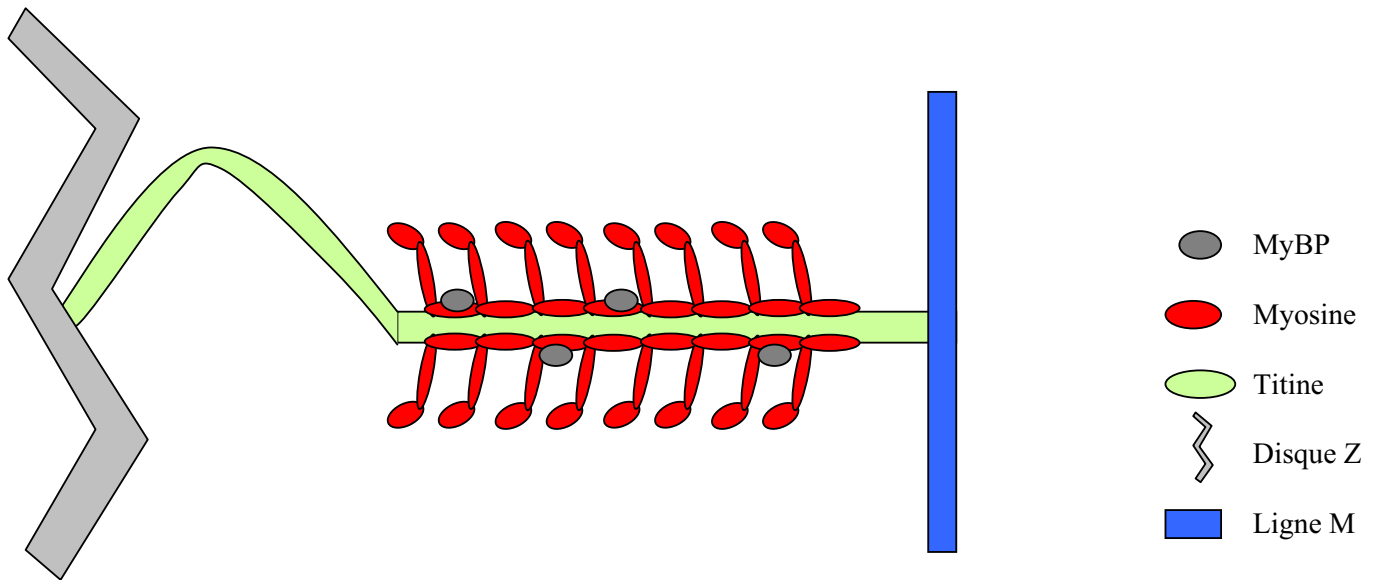


Figure 13. Le filament épais

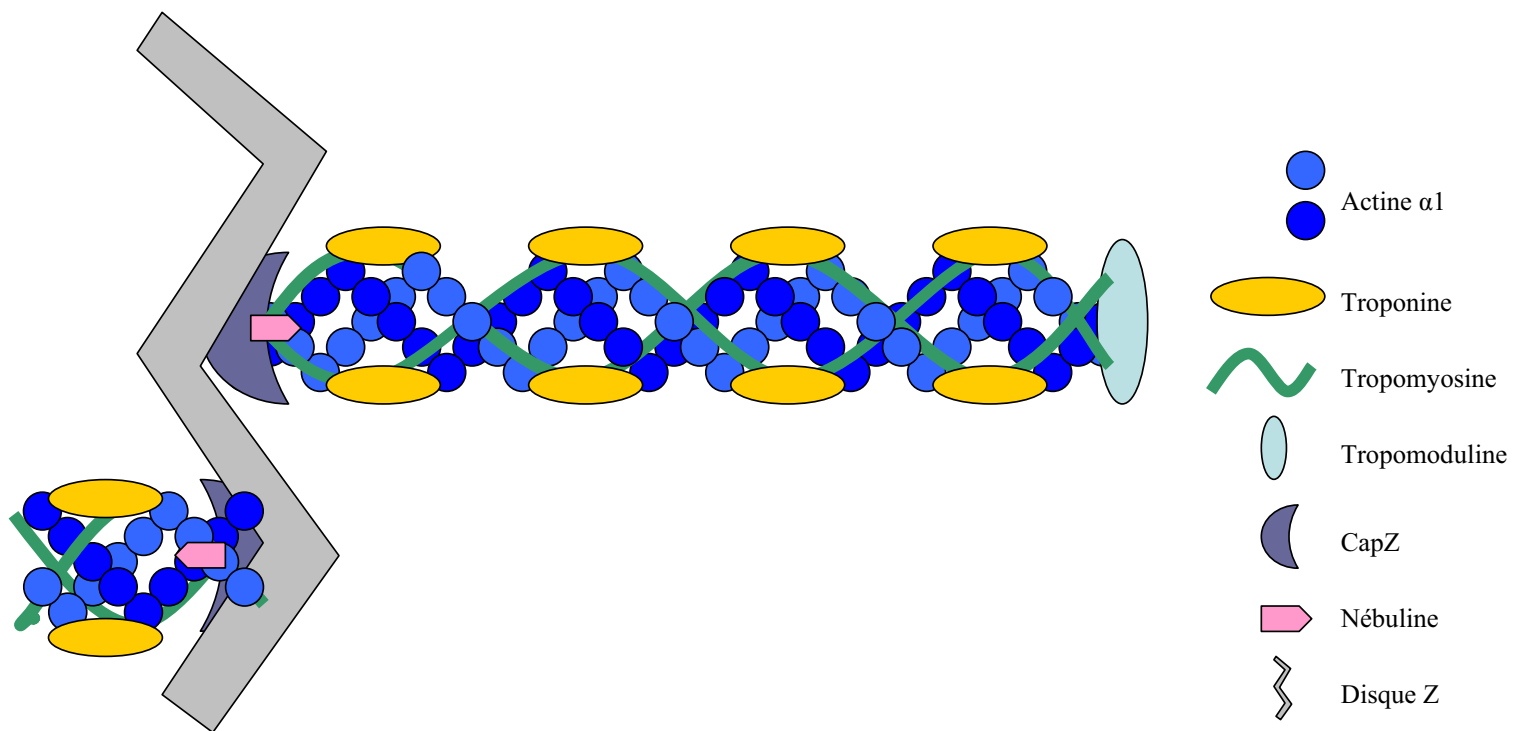


Figure 14. Le filament fin

actrice essentielle dans la longueur et l'orientation du filament épais. En effet, les têtes de myosine (partie N-terminale de la chaîne lourde) sont dirigées vers les filaments d'actine, et les queues (partie C-terminale) vers la ligne M. L'épaisseur du filament épais est régulé par les MyBP (Myosin Binding Protein) lors de sa formation, qui se fixent sur les filaments de myosine. La MyBP-C établit un lien entre le filament de myosine et la titine. L'adénosine monophosphate déaminase est fixée sur les chaînes lourdes de myosine ainsi que sur la titine. Elle est impliquée dans les changements métaboliques du muscle, dont la régulation est importante pour le bon fonctionnement musculaire. Des mutations dans le gène de l'AMP-déaminase mènent à des myopathies.

Les protéines du filament épais

Myosine – Titine – MyBP – AMP-déaminase

II.1.8 Les filaments fins

Les filaments fins forment les bandes I caractéristiques des myofibrilles et sont reliés entre eux par le disque Z (Figure 14). Les filaments fins sont des fibres d'actine $\alpha 1$. En effet, l'actine globulaire, ou actine-G, se polymérise pour former ces fibres, devenant l'actine-F. Ces filaments ont une structure en double hélice et sont orientés au sein du filament fin (Clark *et al* 2002). En effet, la fibre d'actine n'est pas figée, elle est dans une dynamique d'association/dissociation. L'extrémité qui croît le plus rapidement est appelée l'extrémité barbelée. L'addition et la perte d'actine sont régulées par CapZ. Cette extrémité est située du côté du disque Z. L'autre extrémité, à la vitesse de croissance plus faible, est appelée extrémité pointue. Sa dynamique d'addition/perte est réalisée par la tropomoduline. Cette extrémité est du côté de la ligne M. La régulation de cette dynamique est essentielle au maintien de la longueur uniforme du filament fin.

La nébuline agit comme un guide moléculaire dans la formation du filament d'actine, régulant sa taille. La tropomyosine s'associe avec l'actine afin de bloquer son interaction avec la myosine. Un dimère de tropomyosine recouvre 7 monomères d'actine. Ce blocage est contrôlé par la troponine.

Les protéines du filament fin

Actine $\alpha 1$ – Nébuline – CapZ – Tropomoduline – Tropomyosine – Troponine

II.1.9 Le collagène

Le collagène est la protéine la plus abondante chez les mammifères et les oiseaux. Il est un constituant essentiel des tissus conjonctifs, présents dans tous les tissus. C'est une protéine qui présente des propriétés de rigidités mécaniques et de résistance au cisaillement et à la compression, composant principal les trois enveloppes du muscles : endomysium, perimysium et epimysium.

Il existe 7 isoformes de collagène dans les muscles squelettiques bovins : I, III, IV, V, VI, XII et XIV (McCormick 1999). Les types I et III sont les principales protéines de la matrice extracellulaire et sont responsables de la transmission de la force des myofibrilles aux tendons des muscles squelettiques.

La force de tension et la stabilité mécanique du collagène sont conférées par la quantité et le type de liaisons entre les molécules de collagène.

Les molécules fibrillaires de collagène sont formées de 3 sous-unités polypeptidiques, appelées hélices α (Lepetit 2004). La séquence d'acides aminés de ces chaînes est différente selon les types de collagène. Les hélices α sont associées par des liaisons hydrogènes pour former une triplehélice. Ces liaisons sont renforcées par la présence de glycine, proline, alanine et hydroxyproline.

Les molécules de collagène subissent des modifications post-traductionnelles :

- Au niveau intracellulaire, certains résidus lysine et proline sont hydroxylés. Certaines lysines sont glycosylées.
- Au niveau extracellulaire, les molécules de collagène sont assemblées en tête-à-queue pour former des microfibrilles. Puis celles-ci s'agrègent par groupe de 5 pour former des fibres matures de collagène.

Différents types de liaisons sont mis en place durant la maturation de la fibre de collagène, dont les liaisons cétoamines (4 par molécules de collagène) et les liaisons pyridinium. Ces dernières lient 3 molécules de collagène ensemble et sont très stables. Les différents types de liaisons évoluent avec l'âge de l'animal. Ainsi, les liaisons très stables de type pyridinium augmentent avec l'âge (Lepetit 2007). De plus, les proportions des isoformes de collagène changent également avec l'âge, le type d'animal et de muscle (Geay *et al* 2001).

II.1.10 Les systèmes protéasiques

Les systèmes protéolytiques identifiés comprennent des matrice-métallopeptidases (MMP), des calpaïnes (calcium dépendantes), des cathepsines (protéines lysosomiales), les caspases, le protéasome et les protéases à sérine (Sentandreu *et al* 2002).

II.1.10.1 Calpaïnes

Ce sont des peptidases à cystéine calcium-dépendante, formant un groupe de peptidases intracellulaires important (Sentandreu *et al* 2002). Les calpaïnes les plus étudiées sont la μ -calpaïne (active à des concentrations en calcium de l'ordre du μ M), et la m-calpaïne (active à des concentrations en calcium de l'ordre du mM). Ce sont des hétérodimères de deux sous-unités : une sous-unité catalytique de 80 kDa (Figure 15), responsable de l'activité peptidase, unique pour chaque enzyme, et une sous-unité de 30 kDa régulatrice commune à toutes les calpaïnes.

Les μ -calpaïnes et m-calpaïnes sont ubiquitaires alors que d'autres sont tissus-spécifique (comme la calpaïne 3 ou p94). Ces μ et m-calpaïnes ont été retrouvées dans les tissus musculaires de toutes les espèces étudiées.

L'activité des calpaïnes est régulée par les ions calcium Ca^{2+} , les phospholipides, et leur inhibiteur spécifique, la calpastatine. Les ions calcium se fixent sur la sous-unité catalytique et régulatrice. Les phospholipides quant à eux se fixent sur la sous-unité catalytique, sous la dépendance des ions calcium. Cela active l'activité des calpaïnes. La fixation des ions calcium et des phospholipides se ferait de manière coopérative. La calpastatine est une protéine polymorphe dont la masse est comprise entre 50 à 172 kDa, et comprend 4 domaines. Chacun possède une activité inhibitrice sur une calpaïne. Les différents isoformes sont les résultantes de mécanisme d'épissages alternatifs, de phosphorylation, et de transcription / traduction initiés à différents sites. Ainsi, la forme phosphorylée de la calpastatine est majoritairement présente dans les fibres lentes, et est minoritaire dans les fibres rapides. Les calpastatines agissent comme des inhibiteurs compétitifs sur les calpaïnes en se fixant sur les sous-unités régulatrices et catalytiques, sous la dépendance des ions calcium.

Le rôle des calpaïnes est encore mal connu, mais leur dysfonctionnement est source de maladies, comme les dystrophies. Ces enzymes auraient un rôle très important dans la physiologie cellulaire, comme la différenciation, l'apoptose, et le turn-over des protéines myofibrillaires.



Figure 15. Structure cristallographique de la sous-unité catalytique de μ -calpaïne de *Rattus norvegicus*



Figure 16. Structure cristallographique de la cathepsine B de *Bos taurus*

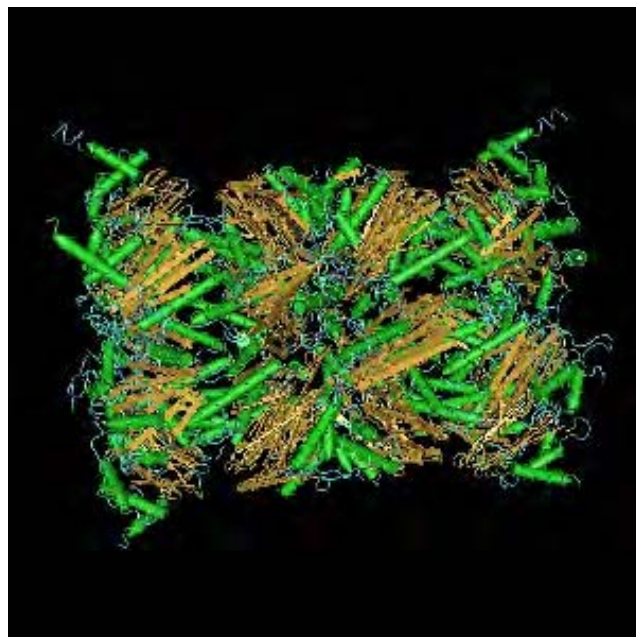


Figure 17. Structure cristallographique du protéasome 20S de *Bos taurus*

II.1.10.2 Cathepsines

Les cathepsines (Figure 16) sont des protéases lysosomiales actives à pH acide (de 3 à 6,5). Elles forment un groupe complexe incluant des exo- et endo-peptidases (Sentandreu *et al* 2002). Plusieurs familles peuvent être distinguées : les protéases à cystéine (cathepsines B, H, L,...), à acide aspartique (cathepsines D et E), et sérine (cathepsine G).

Leur activité est contrôlée par le pH, l'activation de leur précurseur, et leurs inhibiteurs spécifiques. Les cathepsines sont actives à pH acides, c'est pourquoi elles fonctionnent au sein du lysosome. Cependant, la cathepsine S semble être active à pH 7, ce qui indiquerait une activité hors du lysosome. L'activité peut aussi être contrôlée par le clivage en N-terminal du propeptide pour devenir une enzyme mature. La présence d'inhibiteurs spécifiques permettrait également de réguler les cathepsines.

Les cathepsines sont régulées par les cystatines, qui forment un groupe d'inhibiteurs de protéases à cystéine. 4 familles peuvent être distinguées sur la base de leur structure primaire. Les cystatines sont présentes dans le cytoplasme, et préviennent donc d'une activité extra-lysosomiale des cathepsines.

Les cathepsines sont considérées comme étant des enzymes intervenant dans les dégradations aspécifiques dans le lysosome. Elles seraient donc impliquées dans de nombreux processus cellulaires, et constituent les cibles de nombreuses études. Certaines, comme les cathepsines B, H et L seraient impliquées dans le développement de cancers au travers de la dégradation de la matrice extracellulaire, ou par l'activation d'autres peptidases (dont les caspases, responsables de l'apoptose). Les cathepsines S, L, B, D et F seraient impliquées dans les mécanismes de présentation d'antigène. Un dysfonctionnement de leur régulation engendrerait des troubles comme le cancer, l'athérosclérose, la maladie d'Alzheimer, des scléroses et désordres musculaires.

II.1.10.3 Protéasome 20S

Le protéasome 20S est un complexe de 700kDa, une structure cylindrique constituée de 4 anneaux (Figure 17). Il possède plusieurs activités catalytiques : une activité chymotrypsine, trypsine et peptidyl-glutamyle (Sentandreu *et al* 2002). Dans la cellule, le protéasome 20S est soit sous forme libre, soit associé avec de grands complexes régulateurs. De nombreux polymorphismes du protéasome 20S existent et les isoformes sont différemment distribués dans tous les tissus et sont retrouvés chez tous les mammifères.

La régulation du complexe est assurée par des activateurs et des inhibiteurs. Certains activateurs, comme PA700 ou PA28, sont bien caractérisés, contrairement aux inhibiteurs. Un pH acide diminue l'activité du protéasome 20S.

Le protéasome 20S a un rôle important dans la protéolyse non lysosomiale. De nombreux événements cellulaires sont concernés tels que : la présentation des antigènes, la différenciation cellulaire, l'apoptose et la dégradation de tissus musculaires. Le protéasome 20S dégraderait plus précisément la troponine C et les chaînes légères de myosine. Sa concentration dans les fibres oxydatives est plus importante que dans les fibres glycolytiques.

A l'instar des calpaïnes, le protéasome 20S cause une dégradation des disques M et Z. Il serait un acteur important de la protéolyse des disques Z dans les fibres oxydatives.

II.1.10.4 Caspases

Les caspases (Figure 18) sont des peptidases à cystéines capables de cliver des protéines après un résidu d'acide aspartique (Sentandreu *et al* 2002). Elles ont un rôle dans l'apoptose (mort cellulaire programmée), dans son initiation et son accomplissement, et pourraient en avoir d'autres dans différents mécanismes cellulaires (notamment dans l'inflammation). Différentes formes ont été identifiées dans différents tissus et dans des organismes aussi variés que les nématodes ou *Homo sapiens*. Une caspase est formée de trois domaines : un domaine N-terminal, dont le rôle est de réaliser les interactions protéine-protéine, un second domaine formant la grande sous-unité portant le site actif, et un troisième domaine qui a un rôle dans la conformation de la protéine. Pour être active, une caspase doit subir divers clivages protéolytiques.

II.1.10.5 Matrice metallopeptidase

Les MMPs forment une grande famille de metalloendopeptidases à zinc, impliquées dans le catabolisme du tissu conjonctif (Figure 19). Dix-huit MMPs, d'un poids moléculaire allant de 25 à 75 kDa ont été identifiées (Sentandreu *et al* 2002). Elles jouent un rôle important dans l'embryogenèse et dans la formation des tissus, et interviennent dans de nombreuses maladies. Les MMPs et leurs inhibiteurs auraient un rôle dans l'apoptose. Chacune de ces MMPs ont une fonction spécifique, en particulier envers un substrat collagénique. L'activité de ces MMPs est contrôlée par l'activation de leurs précurseurs et par l'interaction avec leurs inhibiteurs. Il existe plusieurs isoformes d'inhibiteurs de MMPs, ayant plusieurs degrés de glycosylation. L'expression des MMPs et de leurs inhibiteurs serait dépendante du type de

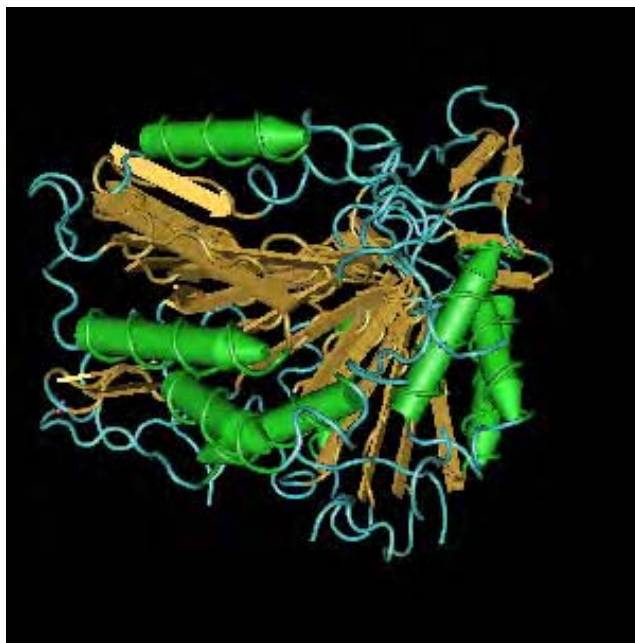


Figure 18. Structure cristallographique de la caspase 7 de *Homo sapiens*

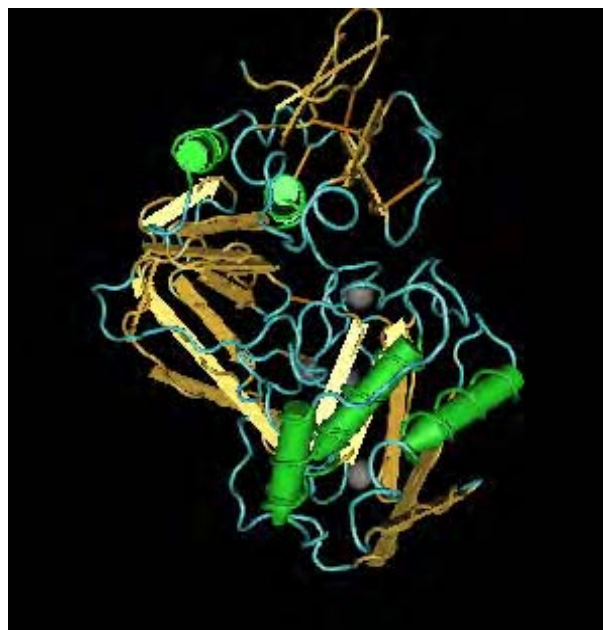


Figure 19. Structure par rayons X d'un complexe de la MMP13 collagénase3 avec son inhibiteur Timp-2 de *Bos taurus*

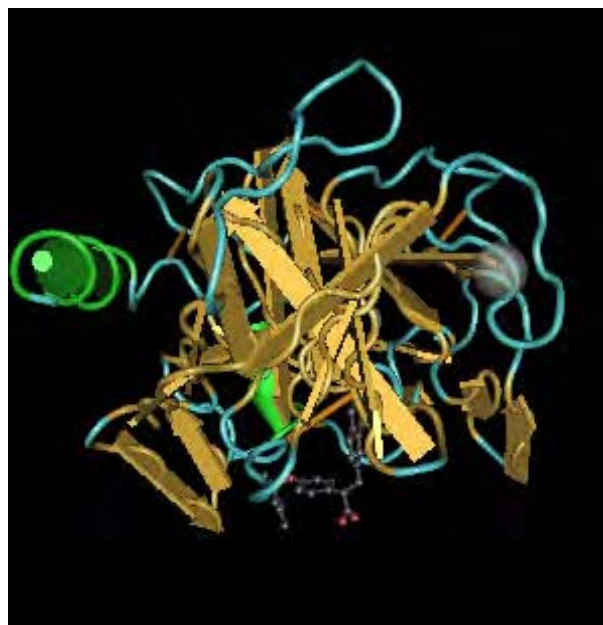


Figure 20. Structure cristallographique de la trypsine complexée avec l'inhibiteur Xa de *Bos taurus*

fibre. Leur fonction précise dans la dégradation du tissu conjonctif est encore inconnue, mais les MMPs sont capables de dégrader les fibres de collagène.

II.1.10.6 Peptidase à sérine

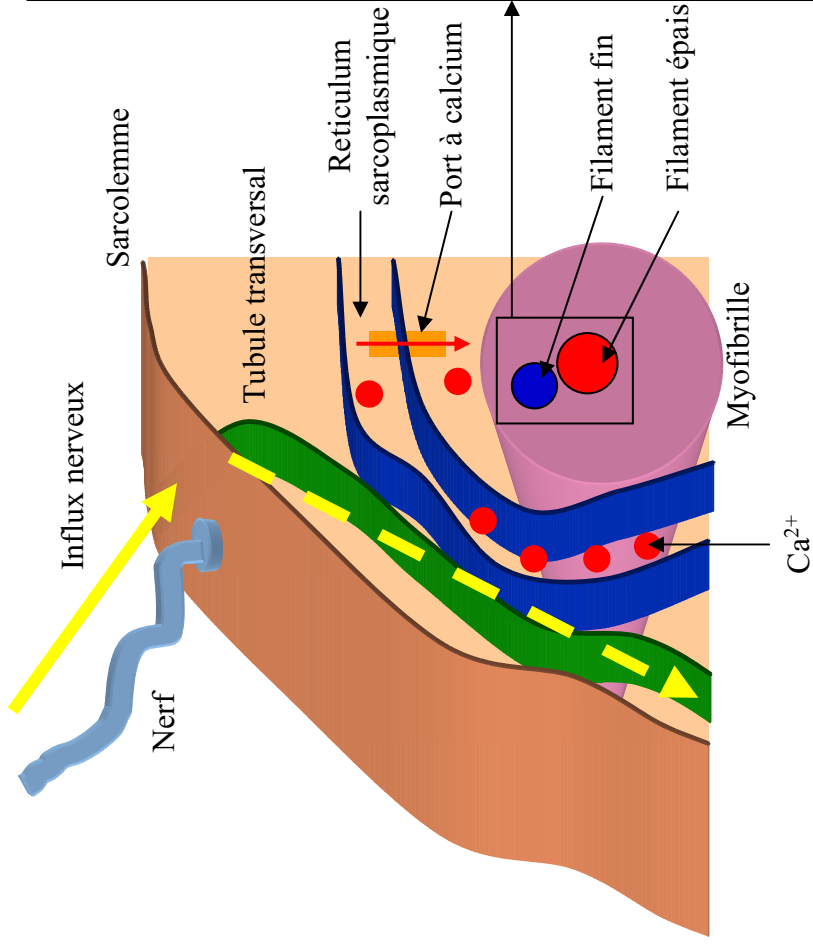
Elles forment un grand groupe d'enzymes protéolytiques dont les plus connues sont les peptidase digestives (trypsine (Figure 20), chymotrypsine) et les thrombines, plasmines (Sentandreu *et al* 2002). La présence de peptidase à sérine a été rapportée dans les muscles squelettiques et celles-ci auraient un rôle dans la régulation du métabolisme des cellules musculaires et l'homéostasie. Des peptidases à sérine sont présentes également dans la matrice extracellulaire. Il existerait ainsi des peptidases à sérine comme la thrombine dans les cellules musculaires, et aussi à haute concentration dans l'espace extracellulaire, comme la plasmine.

Les inhibiteurs de peptidase à sérine forment une famille complexe parmi lesquelles la plus importante est la famille des serpins, acronyme pour inhibiteurs de protéases à sérine. Les serpins régulent des mécanismes comme la coagulation, l'apoptose et l'inflammation.

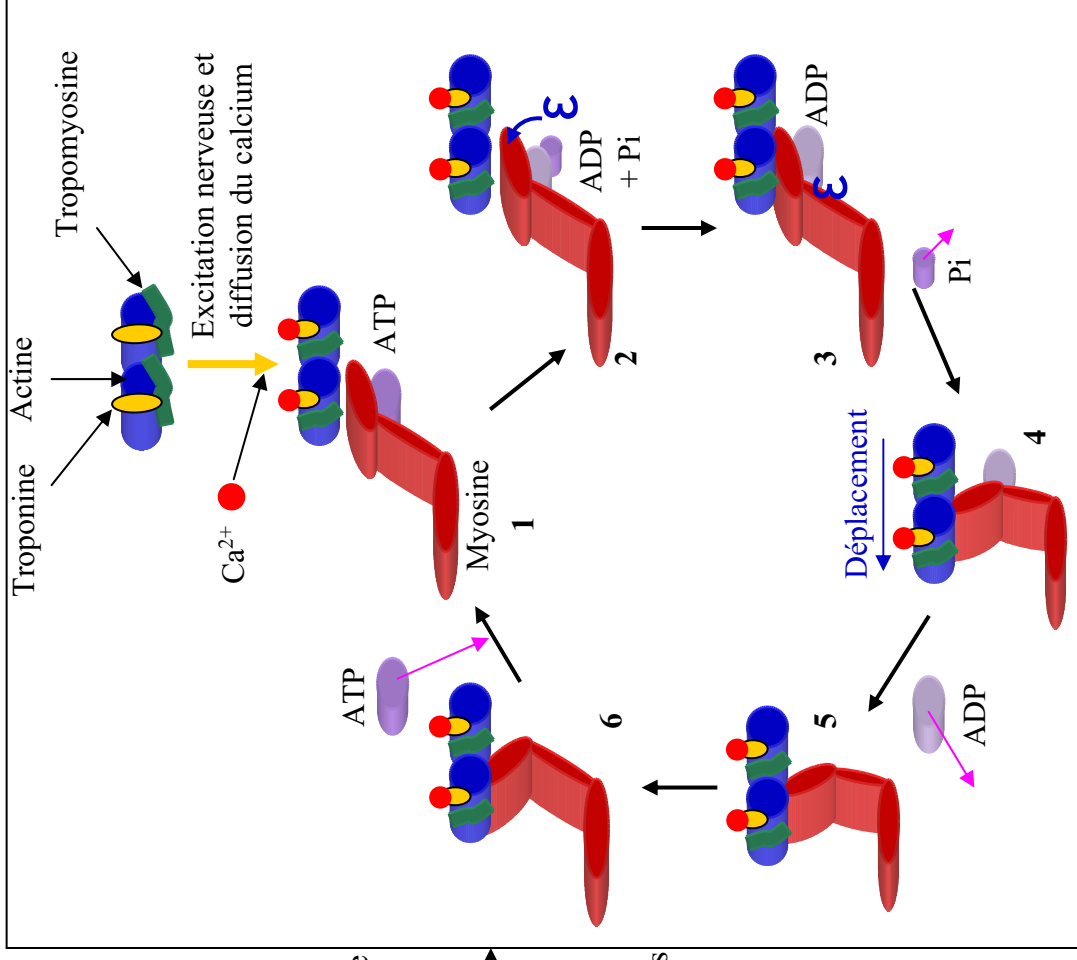
II.2 La contraction musculaire

La contraction musculaire (pour revue : Gordon *et al* 2000) se produit lorsque les fibres musculaires sont dépolarisées en réponse à un stimulus nerveux, capté par la fibre via la plaque motrice puis propagé dans toute la cellule par le tubule transversal, juxtaposant le reticulum sarcoplasmique (Figure 21A). Ce reticulum stocke dans sa lumière des ions Ca^{2+} , qui diffusent dans les myofibrilles, suite à l'ouverture de ports excités par le potentiel d'action. Les ions vont se fixer à la troponine, ce qui va modifier sa conformation (21B). La tropomyosine, associée à la troponine, va également subir une modification de sa conformation, ce qui va découvrir le site de fixation de la myosine sur l'actine.

La myosine, complexée à l'ATP (Figure 21B-1), va hydrolyser cette molécule énergétique en ADP et un phosphate inorganique (Figure 21B-2). L'énergie produite est accumulée par la myosine, qui est activée. La myosine se complexe alors à l'actine, pour former l'actomyosine (Figure 21B-3). Cela entraîne la libération du phosphate inorganique. Grâce à l'énergie accumulée, la myosine change de conformation (Figure 21B-4). La tête pivote, ce qui entraîne le déplacement du filament d'actine vers le centre du sarcomère. La molécule d'ADP est ensuite libérée (Figure 21B-5). Le complexe actomyosine est stable (Figure 21B-6) et sans apport d'ATP, la tête de myosine ne peut pas se dégager de l'actine. Cet état est à l'origine de



A. Excitation et diffusion du calcium



B. Cycle de contraction de l'actomyosine

1. La myosine est complexée à l'ATP. 2. L'hydrolyse de l'ATP permet d'activer la myosine. La protéine acquiert l'énergie (ϵ) de l'hydrolyse. L'ADP et P_i restent fixés à la myosine. 3. La myosine se fixe à l'actine et libère le P_i . 4. Par un changement de conformation grâce à l'énergie, la tête de la myosine pivote, ce qui rapproche l'actine du centre du sarcomère. 5. L'ADP est libéré. 6. En absence d'ATP, le complexe actomyosine ne se dissout pas. Il faut l'apport d'ATP pour dissocier le complexe et initier un nouveau cycle.

Figure 21. Contraction musculaire

la *rigor mortis*. La fixation d'une molécule d'ATP permet de dissocier ce complexe, et d'engager un nouveau cycle de contraction.

Lorsque le signal nerveux est stoppé, les Ca^{2+} -ATPase du reticulum sarcoplasmique fixent les ions calcium pour les stocker dans la lumière du reticulum. Ces ATPases sont en compétition avec la troponine, mais leur meilleure affinité pour le calcium a comme conséquence un retour à la concentration initiale en Ca^{2+} au sein de la fibre musculaire. La troponine, libérée du Ca^{2+} , retrouve sa conformation originale, et la tropomyosine également. Cette dernière recouvre alors le site de fixation de la myosine sur l'actine, ce qui empêche un cycle de contraction.

II.3 Le métabolisme énergétique de la fibre musculaire

La contraction musculaire fait intervenir l'ATP, molécule énergétique, pour rompre le complexe actomyosine, mais également pour stopper l'action des ions Ca^{2+} . La fibre musculaire a donc un besoin important de restaurer les molécules d'ATP à partir de l'ADP. Le glucose est un substrat énergétique essentiel, qui va être métabolisé par la cellule pour régénérer des molécules d'ATP, par la voie de la glycolyse (voie d'Embden-Meyerhof-Parnas).

II.3.1 La glycolyse

La glycolyse, voie anaérobie car n'utilisant pas d'oxygène, se déroule dans le cytosol de la fibre musculaire et fait intervenir de nombreuses enzymes (Figure 22). Le glycogène, molécule de stockage du glucose, sert également de point de départ de la réaction. Le glucose et le glycogène sont transformés en glucose-6-P, par l'action de l'hexokinase pour le glucose, et par l'action de la phosphorylase et la phosphoglucomutase pour le glycogène. Le glucose-6-P est transformé en fructose-1,6-biP par l'action des enzymes phosphoglucose isomérase et phosphofructokinase. Ce fructose, par la réaction de l'aldolase et la triose phosphate isomérase, génère deux molécules de glycéraldéhyde-3-P. La transformation d'une molécule de ce substrat par la glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase en 1,3-biphosphoglycérate fait intervenir la réduction d'un cofacteur, le NAD^+ , en $\text{NADH} + \text{H}^+$. La suite de la réaction fait intervenir les enzymes phosphoglycérate kinase, phosphoglycérmutase, émolase et pyruvate kinase, pour produire en fin de réaction du pyruvate. Ainsi, en prenant en compte les 2 molécules d'ATP nécessaires à l'initiation de la réaction, la glycolyse permet de produire, à partir d'une molécule de glucose, 2 molécules d'ATP, de $\text{NADH} + \text{H}^+$ et de pyruvate. C'est un

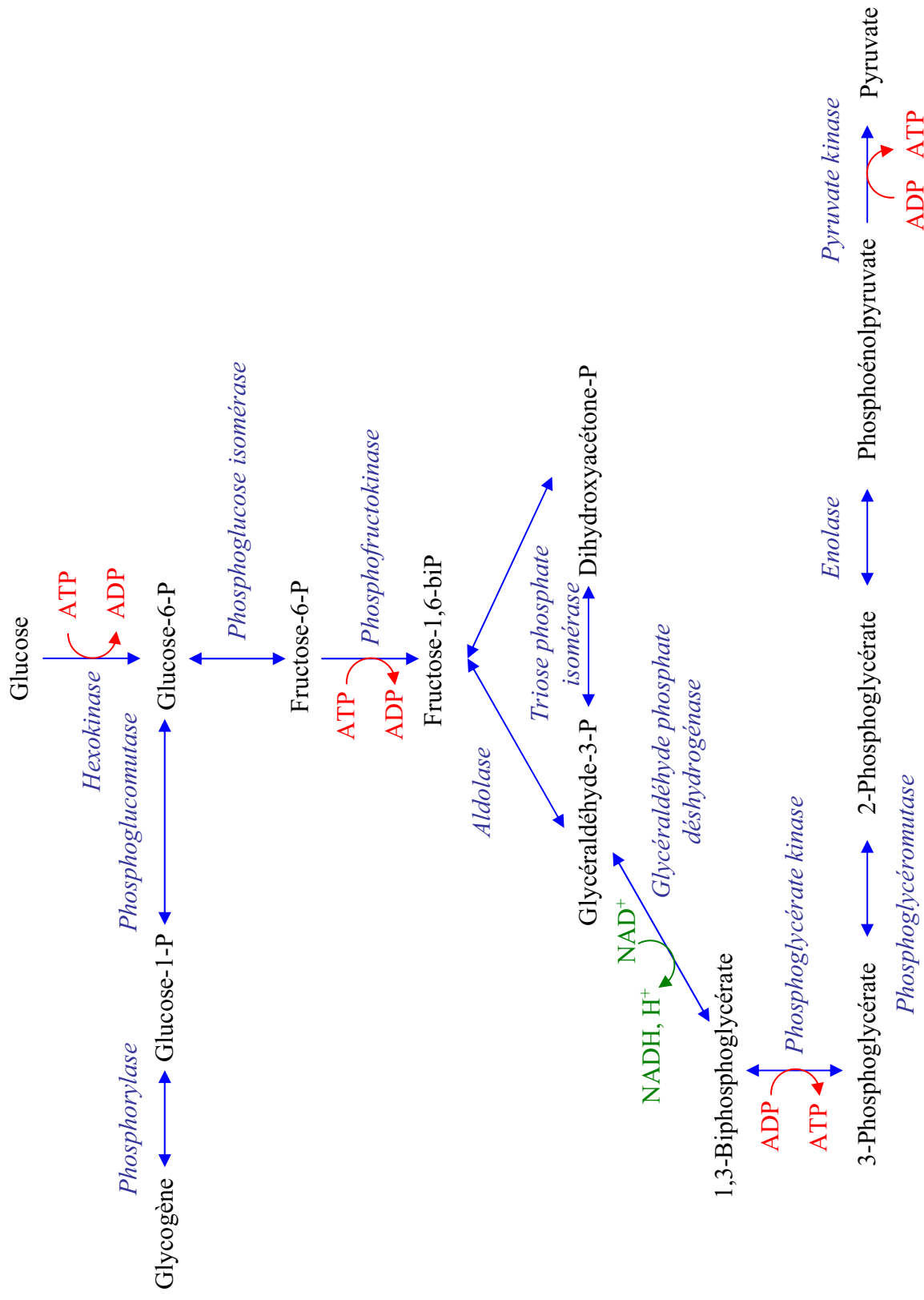


Figure 22. Voie de la glycolyse

rendement très faible, car le pyruvate contient encore beaucoup d'énergie. Mais la glycolyse a l'avantage d'être rapide, et n'a pas besoin d'oxygène pour fonctionner. C'est un atout important lorsque la fibre musculaire fournit un effort soudain par exemple. La glycolyse est régulée principalement au niveau de deux enzymes : la phosphofructokinase et la pyruvate kinase. Le pyruvate sert de substrat pour deux autres voies métaboliques : la production de lactate et la voie aérobie.

II.3.2 Production de lactate

Cette réaction de fermentation permet l'oxydation anaérobie du NADH, régénérant le NAD^+ . Dans les cellules musculaires, il s'agit de fermentation lactique, se déroulant dans le cytosol de la fibre. Cette réaction, réalisée par la lactate déshydrogénase, permet de transférer les électrons du NADH vers le pyruvate et ainsi de régénérer le NAD^+ et d'obtenir du lactate (Figure 23A). Le lactate n'est pas utilisable par les fibres musculaires. Il s'accumule dans le muscle. Cette accumulation constitue un signal de fatigue musculaire. Le lactate passe dans le sang, et est transporté jusqu'au foie, où il sera transformé en pyruvate.

II.3.3 La voie aérobie

Le pyruvate est transporté dans la mitochondrie, organite dans lequel se produit la voie aérobie (Figure 23B). Cette voie, comprenant le cycle de l'acide tricarboxylique, produit du CO_2 , du GTP, du NADH^+ et du FADH_2 . Les enzymes intervenant dans cette voie sont : pyruvate déshydrogénase, citrate synthase, aconitase, isocitrate déshydrogénase, α -cétoglutarate déshydrogénase, succinyl-CoA synthase, succinate déshydrogénase, fumarase, et malate déshydrogénase. Les molécules NADH^+ et FADH_2 sont utilisées dans la chaîne respiratoire mitochondriale pour produire de l'ATP (Figure 24). Cette chaîne est constituée de 5 complexes protéiques : NADH-ubiquinone réductase (I), Succinate-ubiquinone réductase (II), Ubiquinone-cytochrome C réductase (III), Cytochrome oxydase (IV) et ATP synthétase (V).

La régénération des molécules de NAD^+ et FAD, respectivement dans les complexes I et II à partir de NADH^+ et FADH_2 , permet un déplacement de protons depuis la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. La formation d' H_2O par le complexe IV à partir de $\frac{1}{2} \text{O}_2$ et 2H^+ renforce le gradient. Cette réserve de protons H^+ permet à l'ATP synthétase de régénérer l'ATP à partir d'ADP et un phosphate. Cette voie permet donc de régénérer les cofacteurs nécessaires au cycle de l'acide tricarboxylique et les molécules

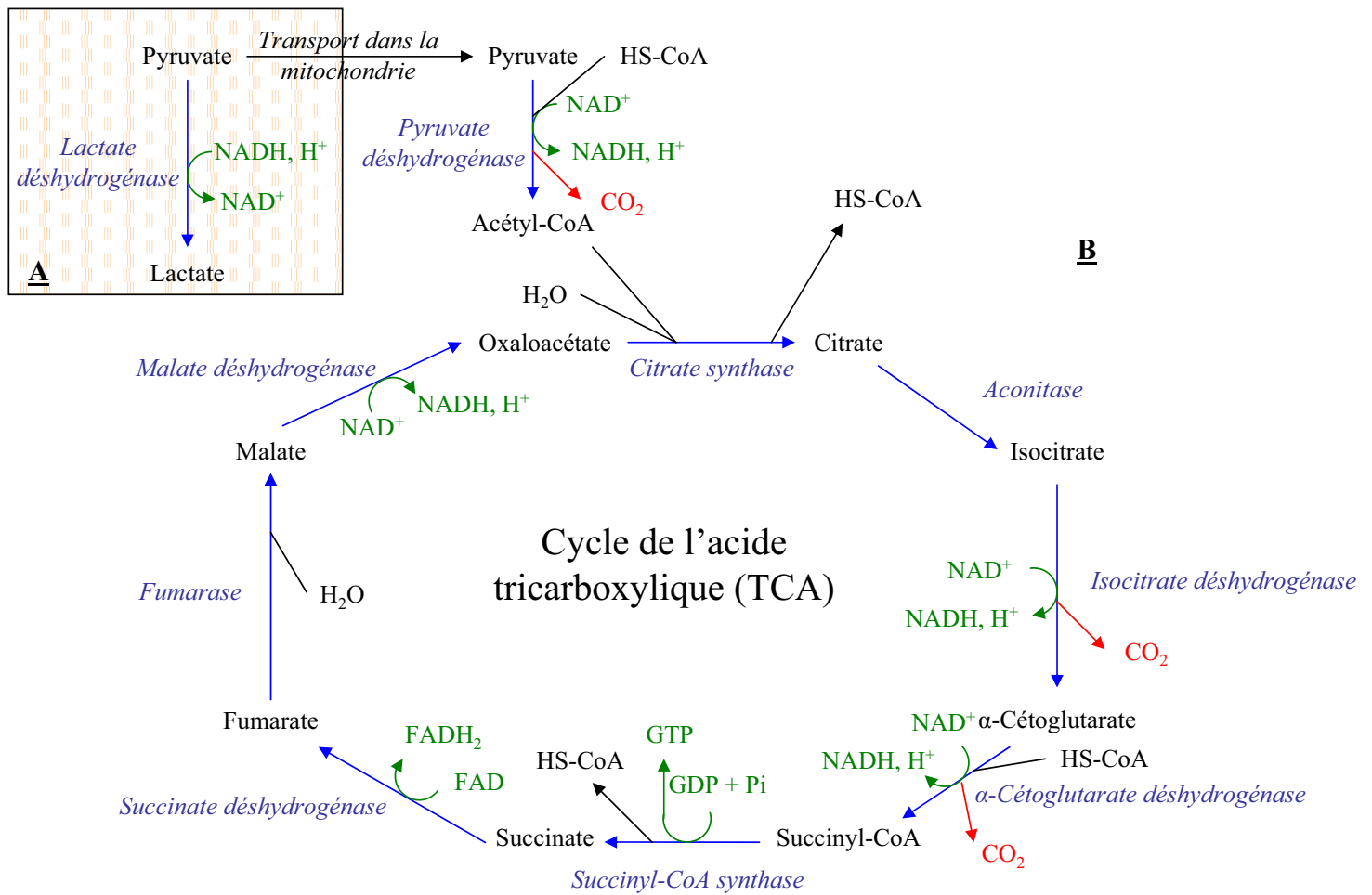


Figure 23. Production de lactate et voie aérobie

A. Production de lactate (cytosol) **B.** Voie aérobie (mitochondrie)

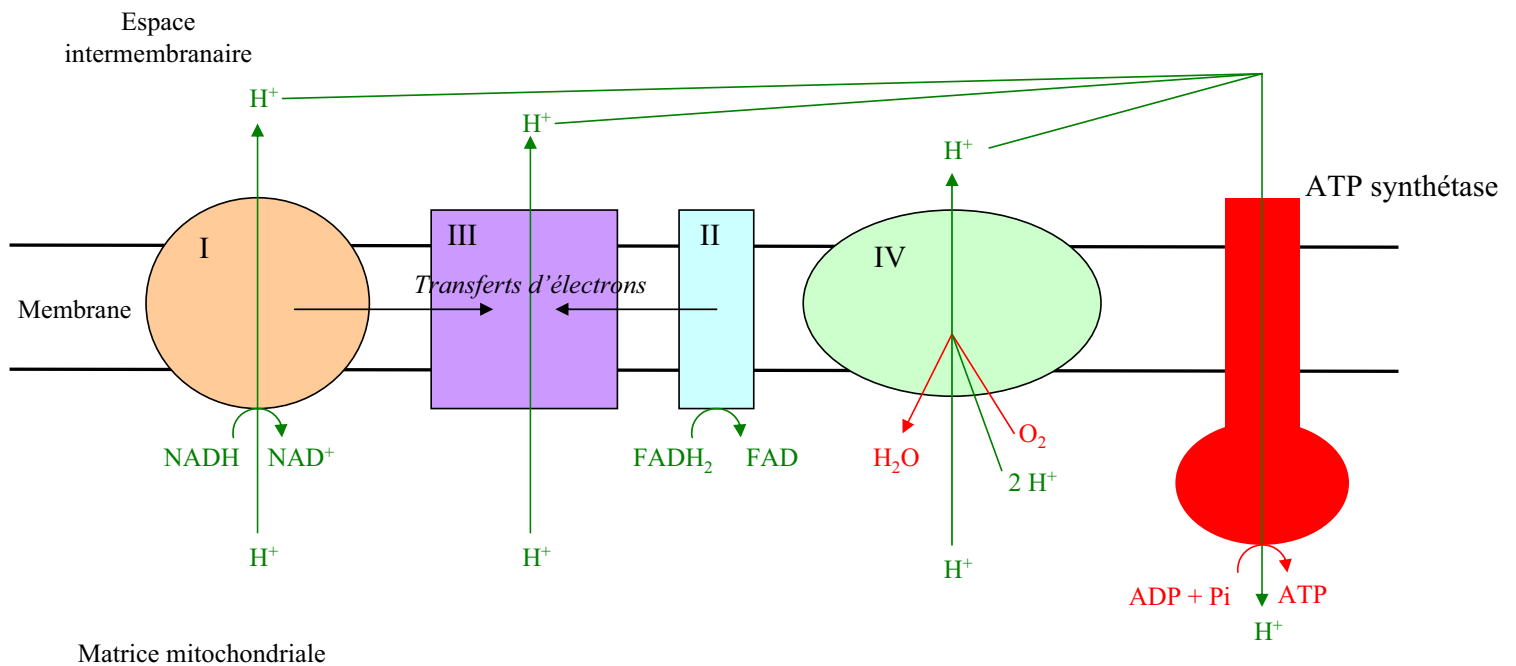


Figure 24. Chaîne respiratoire mitochondriale

d'ATP. Pour une molécule de glucose, la voie aérobie permet de produire 36 à 38 molécules d'ATP. Ce rendement est plus élevé que celui de la glycolyse. La voie aérobie permet de produire beaucoup d'énergie, mais nécessite plus de temps pour se mettre en place. C'est un atout pour la fibre lors d'un effort constant et long.

II.3.4 Intégration des différentes voies

Le métabolisme énergétique de la fibre musculaire ne fait pas intervenir une seule et unique voie. En effet, les différentes voies sont connectées entre elles de par leurs substrats et produits communs (Figure 25). Les lipides permettent également à la cellule de produire de l'énergie par le cycle des acides gras. Ces différentes voies sont régulées en fonction des besoins et des caractéristiques de la fibre musculaire (pénurie d'oxygène, besoins énergétiques importants...). Une fibre peut ainsi être orientée vers un métabolisme plus glycolytique ou oxydatif. Les muscles peuvent être glycolytiques ou oxydatifs, avec toutes les nuances possible, afin d'assurer au mieux leur fonction (muscle de posture à contraction lente mais longue, ou muscle de mouvement à contraction rapide). Ces régulations du métabolisme influencent les quantités et propriétés des différents acteurs concernés (enzymes, produits et substrats).

II.4 Les protéines chaperonnes

Le repliement des protéines, étape indispensable pour l'acquisition de la forme tridimensionnelle et active de la protéine, est un processus pouvant générer des protéines aberrantes, mal conformées ou partiellement repliées, susceptibles de réagir avec d'autres composants cellulaires et de former des agrégats. Par exemple, la maladie de Parkinson et la Chorée de Huntington sont des maladies neuro-dégénératives dues à des agglomérats de protéines mal conformées, détruisant les neurones. Afin d'encadrer le repliement des protéines, les cellules disposent de protéines spécialisées, les chaperonnes moléculaires. La plupart d'entre elles portent un nom commençant par la mention HSP pour « Heat Shock Protein » ou « Protéine de Stress Thermique », car les premières à avoir été découvertes sont impliquées dans des mécanismes de défense contre le stress thermique. Ces chaperonnes se fixent sur les polypeptides en cours de synthèse et les chaînes polypeptiques neo-synthétisées, prévenant leur agrégation et les interactions indésirables avec d'autres protéines. De plus, elles favorisent leur repliement correct ainsi que l'assemblage des complexes protéiques. Ces chaperonnes moléculaires protègent également les protéines cellulaires lors de stress

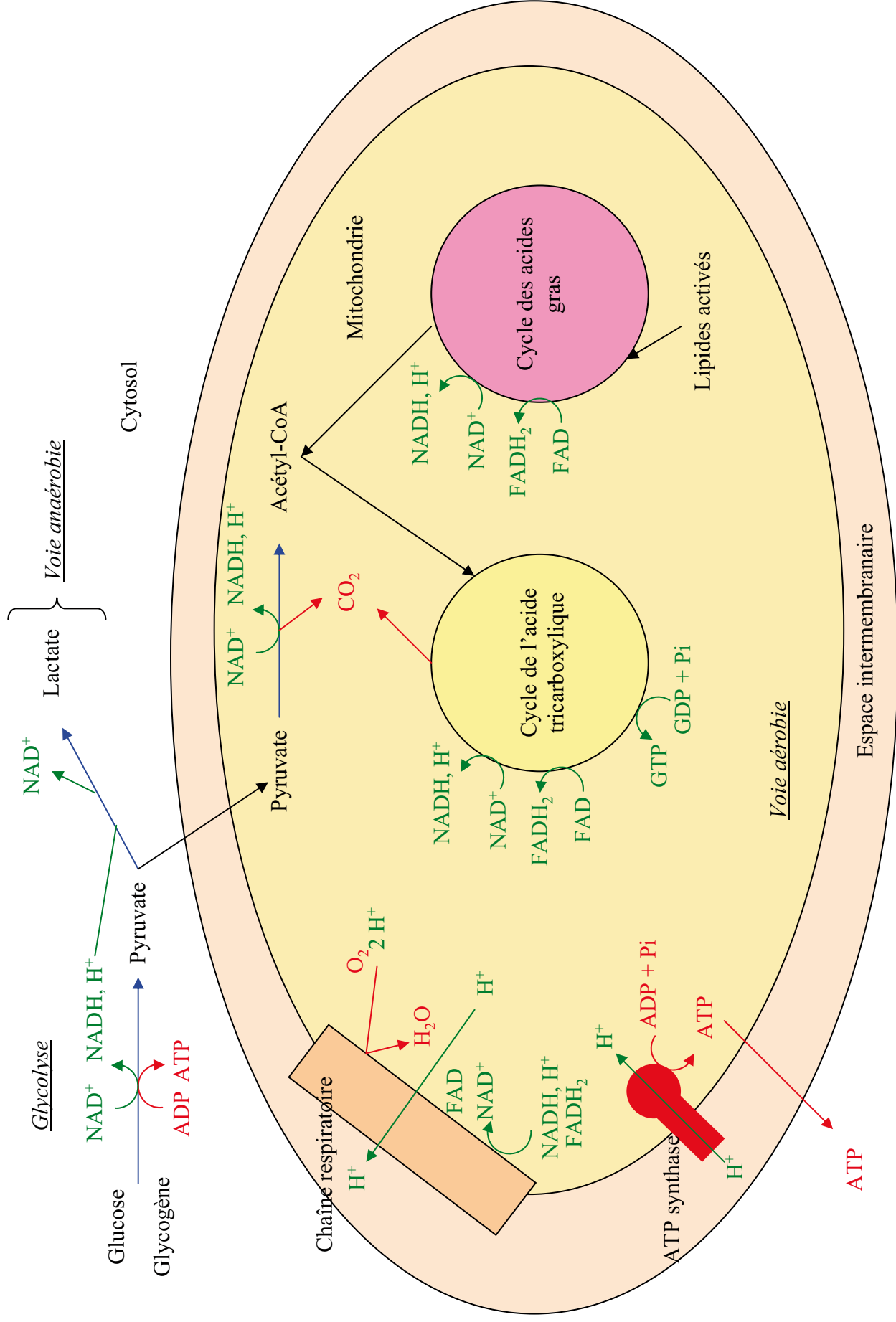


Figure 25. Intégration des différentes voies métaboliques dans la fibre musculaire

cellulaires (thermique, oxydant), en empêchant leur agrégation et en maintenant leur fonctionnement (Fink 1999). La cellule contient un ensemble de chaperonnes différentes formant des réseaux d'interaction et de complémentarité (Young *et al* 2004). Il existe ainsi plusieurs familles majeures de chaperonnes : Hsp20, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 et Hsp100.

II.4.1 Hsp20

Cette famille est constituée de Hsp (par exemple Hsp20, Hsp27 et α B-crystalline) dont la taille est comprise entre 12 et 43 kDa. Ces chaperonnes fonctionnent indépendamment de l'ATP. Beaucoup sont produites en condition de stress. Elles préviennent la formation d'agrégats, et ont une haute affinité pour les chaînes polypeptidiques intermédiaires formées lors de leurs repliements.

II.4.2 Hsp40

C'est une famille composée de plus de 100 membres différents, caractérisés par la présence d'un domaine DnaJ hautement conservé. Les Hsp40 sont des co-chaperonnes des Hsp70. En effet, le domaine DnaJ stimule l'activité ATPasique des Hsp70, conduisant à la stabilisation des complexes. Les Hsp40 sont également des chaperonnes à part entière, se fixant sur des protéines non repliées et des chaînes polypeptidiques en formation qu'elles adressent à la machinerie des Hsp70.

II.4.3 Hsp60

Les Hsp60 (GroEL chez *Escherichia coli*) encapsulent les polypeptides dans une cavité, avec Hsp10 (GroES chez *Escherichia coli*) et en utilisant de l'ATP. Cela prévient ainsi les interactions avec d'autres composants de la cellule. Ce complexe facilite le repliement des protéines.

II.4.4 Hsp70

C'est une grande famille de chaperonnes impliquées dans le repliement des protéines, mais également dans d'autres fonctions cellulaires. Les Hsp70 ont une faible activité ATPasique, augmentée par la fixation de Hsp40. Il existe plusieurs dizaines de Hsp70 dans une cellule (par exemple Hsp70-1A, Hsp70-8 et Hsp70-GRP75), dont des formes cytosoliques,

mitochondriales, ou induites par le stress. Les Hsp70 sont les chaperonnes dominantes pour les protéines en cours de synthèse.

II.4.5 Hsp90

Les Hsp90 possèdent beaucoup de similitudes avec les Hsp70. Elles interagissent avec des éléments du cytosquelette, des transducteurs de signaux (comme le récepteur à la progestérone) et des protéines kinases. Elles jouent un rôle important en modulant l'activité des protéines.

II.4.6 Hsp100

Ces Hsp permettent aux cellules de survivre aux stress extrêmes. Ce sont les seules Hsp pouvant solubiliser les agrégats protéiques formés par la chaleur. Elles sont impliquées dans diverses fonctions, comme la protéolyse. Elles pourraient agir avec les Hsp40 et les Hsp70 pour augmenter l'action de ces dernières sur le repliement des protéines.

II.4.7 Quelques mécanismes

Les Hsp70 se fixent sur les protéines en cours de synthèse de manière ATP-dépendante. Le complexe formé par Hsp40 et Hsp70 protège les polypeptides en formation de l'agrégation, et contrôle leur repliement à la fin de la synthèse. Ce complexe est associé aux chaînes ribosomales. Hsp60 est complexée aux protéines synthétisées. Hsp40 et Hsp70 ont plutôt un rôle précoce, tandis que Hsp60 a un rôle plus tardif. Les systèmes Hsp70 et Hsp60 sont complémentaires et agissent en synergie en formant un réseau de chaperonnes.

Les Hsp70 et Hsp40 jouent un rôle clé dans l'import et l'export de protéines mitochondriales. Ces deux chaperonnes forment, avec la protéine cible, un complexe d'import ou d'export.

Les Hsp ont également une fonction anti-apoptotique, en séquestrant des facteurs pro-apoptotiques comme Bax. Les Hsp favorisent la survie cellulaire.

II.5 L'apoptose

L'apoptose est un mécanisme physiologique de mort cellulaire programmée (Taylor *et al* 2008). Cela permet d'éliminer les cellules endommagées ou dangereuses pour les autres cellules. C'est un phénomène essentiel à la vie d'un organisme, notamment au cours de son développement. C'est un processus très conservé depuis les organismes unicellulaires

jusqu'aux mammifères. Il est réalisé en particulier par les caspases, activées par deux voies principales (Figure 26).

Dans un premier cas, le stimulus est externe à la cellule et correspond à l'activation d'un récepteur de mort cellulaire par un ligand activateur, comme TNF α . Le récepteur recrute et active la caspase 8, qui à son tour, active par protéolyse les caspases 3 et 7. Cela mène à l'activation des caspases.

Dans le deuxième cas, l'événement activateur est la rupture de la membrane mitochondriale par un stress cellulaire. Cela aura pour conséquence l'efflux du cytochrome c dans le cytoplasme. Le cytochrome c forme avec d'autres protéines (Apaf-1, caspase 9) un complexe nommé l'apoptosome, qui va activer des caspases. Durant ces phénomènes de stress, des protéines du choc thermiques (HSP) sont synthétisées et ont un rôle anti-apoptotique, par formation d'un complexe avec les caspases pour les inhiber, par séquestration des facteurs pro-apoptotiques (comme le cytochrome c), par la protection des protéines cibles et les prévenir de la dégradation, et enfin par le rétablissement des structures protéiques.

Les caspases vont alors dégrader différents constituants de la cellule, notamment le cytosquelette. Ainsi, des protéines comme l'actine, la myosine, la spectrine, l' α -actinine, la tubuline, la vimentine et la kératine sont protéolysées. Cela mène à un affaissement de la cytostructure de la cellule, ce qui lui confère un aspect caractéristique au microscope photonique. Les caspases dégradent la lamina nucléaire et fragmentent l'ADN de manière caractéristique. Elles clivent certains composants des jonctions adhérentes cellulaires, comme les caténines et les cadhérines. Les cellules en apoptose se rétractent alors et ne sont plus en contact avec la matrice extracellulaire et d'autres cellules. Les caspases ciblent aussi des constituants assurant des fonctions de routine de la cellule, comme les facteurs de traduction, de transcription et les ARN ribosomiaux. L'appareil de Golgi, le reticulum endoplasmique, et les mitochondries se disloquent. Plusieurs centaines d'autres protéines sont la cible des caspases, comme certaines enzymes du métabolisme. Enfin, les cellules en apoptose exhibent des marqueurs spécifiques sur leur membrane, comme la phosphatidylsérine et l'annexine-1, ce qui constitue un signal de reconnaissance pour les phagocytes. Ces derniers éliminent les cellules par phagocytose.

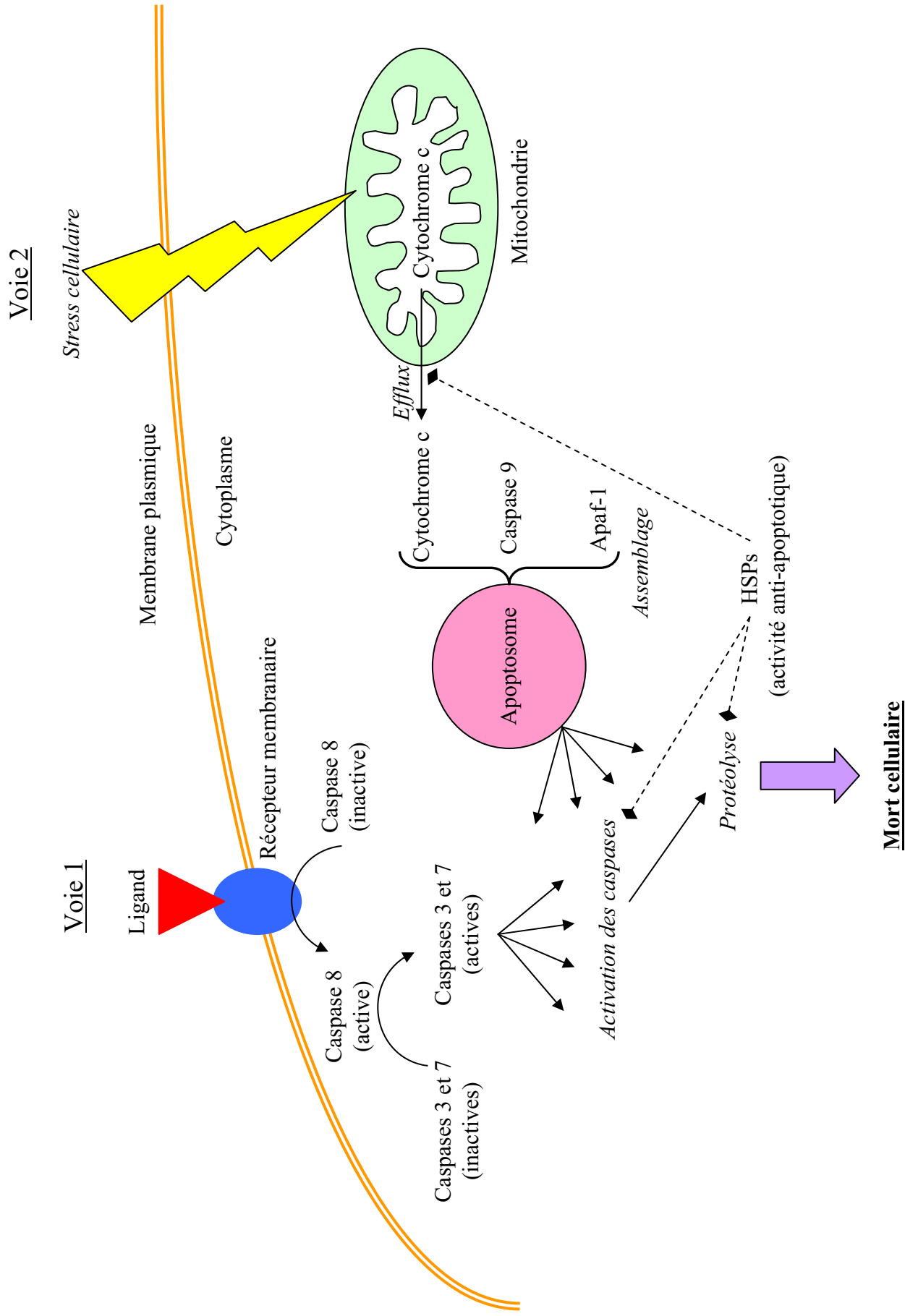


Figure 26. Voies d'activation de l'apoptose par les caspases

III Les qualités sensorielles de la viande bovine

Les qualités sensorielles de la viande bovine (couleur, flaveur, jutosité, tendreté) dépendent de la composition et des propriétés structurales du muscle, en particulier de ses deux composantes majeures que sont la trame conjonctive et les myofibres. Elles sont dépendantes des caractéristiques de l'animal et du muscle, mais évoluent également en fonction des traitements de maturation lors de la transformation du muscle en viande après l'abattage de l'animal (Hocquette *et al* 2005b, 2005a).

III.1 La couleur

La couleur est une qualité visuelle importante car c'est la première perçue par le consommateur au moment de l'achat, en particulier dans les grandes surfaces où la viande est en libre service.

La couleur dépend de la teneur et de l'état de la myoglobine du muscle (Monin 1991).

Elle varie en fonction de l'état d'oxydation de la myoglobine : la myoglobine réduite non oxygénée est rouge pourpre, la myoglobine réduite oxygénée est rouge-vif, la myoglobine oxydée est rouge-brun. Cette dernière coloration entraîne une réaction de rejet de la part du consommateur.

Le type métabolique du muscle est un facteur de première importance pour la stabilité de la couleur. En effet, le taux de pigments (donc de myoglobine) varie du simple au double en fonction du muscle de la carcasse. De plus, plus le muscle est oxydatif, plus la formation de myoglobine oxydée rouge-brun (impact négatif sur le consommateur) est rapide.

Le pH joue un rôle important dans l'état de la myoglobine. A pH élevé (supérieur à 6) l'activité respiratoire est plus facilement maintenue, favorisant ainsi la réduction de la myoglobine, ce qui amène une coloration pourpre. De telles viandes sont qualifiées de « viandes à coupe sombre ».

L'âge de l'animal influe aussi sur la quantité de myoglobine. Celle-ci augmente rapidement jusqu'à deux ans. L'augmentation devient plus modérée par la suite.

III.2 La flaveur

C'est une qualité organoleptique qui fait appel aux sens gustatifs et olfactifs, dont la perception est complexe. La flaveur est très différente d'un muscle à un autre (Monin 1991). Ainsi, le muscle *Rectus abdominis* est réputé pour avoir une flaveur plus développée que

Psoas major. Le type métabolique des muscles serait un facteur important pour la flaveur. En effet, les fibres oxydatives, contenant plus de lipides, jouent un rôle important dans la détermination de la flaveur. D'autre part, la flaveur se développe avec l'âge, la teneur en lipides augmentant lorsque les animaux vieillissent (Touraille 1994).

La flaveur va également évoluer au cours de la cuisson, par les réactions de Maillard (entre acides aminés et sucres réducteurs) et par la dégradation des lipides, triglycérides et phospholipides.

Les mécanismes biologiques à l'origine de la flaveur sont complexes et ne sont pas totalement élucidés.

III.3 La jutosité

La jutosité est d'abord due à une libération d'eau provoquée par la mastication, puis à la stimulation de la salivation par les lipides (Monin 1991).

La teneur en eau est variable d'un muscle à un autre. Ainsi, le *Diaphragma* est caractérisé par 71,6% d'eau et le *Brachialis* 77,2%. Cette teneur varie inversement à la teneur en gras. La capacité de rétention d'eau est liée au pH du muscle, mais de grandes variations sont observées entre muscles de même pH. Une viande à pH très faible aura tendance à perdre son eau et devenir sèche, une viande à pH élevé a une bonne rétention d'eau et donc une jutosité supérieure (Touraille 1994). Il a été montré que les pertes en eau des muscles rouges oxydatifs sont plus importantes que pour les muscles blancs glycolytiques. De plus, une viande riche en lipides est moins sèche qu'une viande maigre. Les facteurs de la rétention d'eau restent encore assez méconnus.

III.4 La tendreté

C'est une qualité de première importance pour le consommateur car elle a un rôle de premier plan lors de la mastication (Touraille 1994). En effet, la tendreté correspond à la capacité d'une viande à être tranchée. Mais c'est une caractéristique qui présente la variabilité la plus importante et la moins maîtrisée, source d'insatisfaction des consommateurs. Elle va évoluer au cours de la phase de transformation du muscle en viande (Ouali 1991) (Figure 27).

En effet, les changements *post-mortem* dans le muscle qui se mettent en place après l'abattage de l'animal vont avoir une importance énorme dans l'évolution de la tendreté. Afin d'appréhender cette dernière, il est nécessaire de comprendre ces changements *post-mortem*.

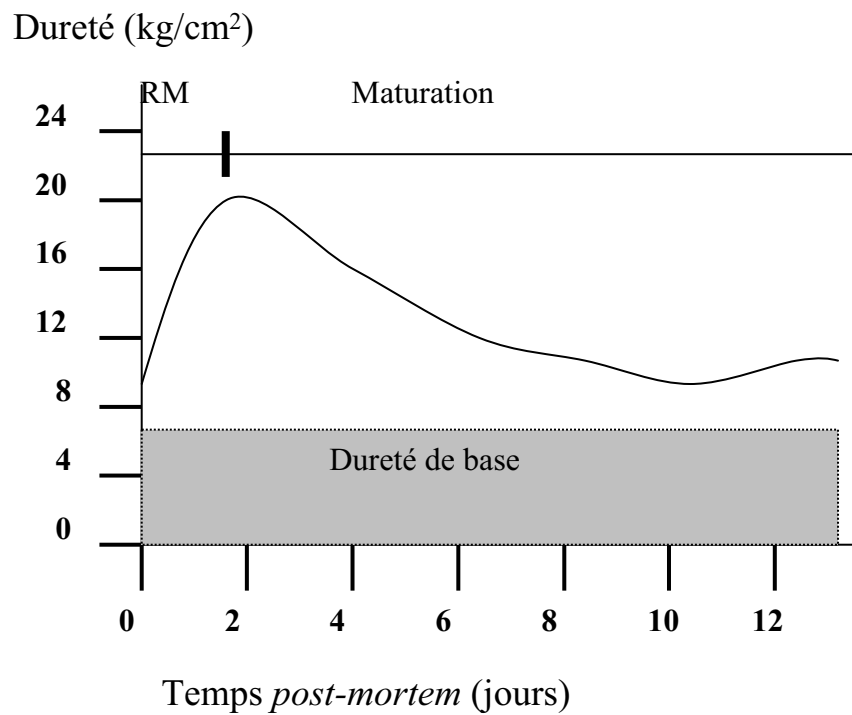


Figure 27. Evolution de la tendreté de la viande au cours de la maturation

RM : *Rigor Mortis*

Adapté de A. Ouali, 1991.

Pendant la période *post-mortem*, les cellules musculaires maintiennent leur homéostasie (Maltin *et al* 2003). Elles ont donc besoin de régénérer les molécules d'ATP. Mais l'arrêt de l'approvisionnement en oxygène et en nutriments les oblige à utiliser la voie anaérobie, la glycolyse. Le glycogène est alors métabolisé pour permettre la régénération des molécules d'ATP, aboutissant en fin de chaîne à la production de lactate. L'accumulation de ce produit acidifie progressivement le muscle, et le pH intracellulaire des cellules musculaires passe d'un pH de 7,2 à un pH ultime de 5,4 – 5,7. Ce pH ultime est important pour différentes qualités organoleptiques de la viande. La nature de la relation entre pH et tendreté n'est pas complètement comprise. Un pH élevé (supérieur à 6) produit des viandes à coupe sombre, sèches et impropres à la consommation à cause du développement favorisé des micro-organismes. Ce fort pH est dû à une réserve de glycogène faible, et donc à une glycolyse faible. Une chute trop forte et rapide du pH aboutit à un pH ultime trop faible (inférieur à 5), ce qui entraîne une couleur défavorable au consommateur et une perte d'eau importante. La chute de pH, plus précisément sa vitesse, dépend aussi de la température à laquelle est placée la carcasse (Ouali 1991). En effet, cette chute de pH est la résultante d'actions enzymatiques inhibées à basse température.

La baisse d'ATP inhibe les ATPases sarcoplasmiques, ce qui mène à la fuite des ions calcium Ca^{2+} dans le reticulum. Le relargage de ces ions du reticulum sarcoplasmique vers la fibre musculaire provoque la contraction de cette dernière. En temps normal, la myosine se détache de l'actine par hydrolyse de l'ATP. La cellule utilise cette molécule énergétique pour se détendre. Mais 24 heures après l'abattage, les réserves en ATP ne sont plus suffisantes pour assurer la décontraction. Les têtes de myosine ne se détachent plus des filaments d'actine et le muscle rentre en état de contraction permanente. C'est la rigidité cadavérique, ou *rigor mortis*. Celle-ci est plus prononcée au bout de 24 à 48 heures après l'abattage. La dureté de la viande est alors maximale.

La tendreté va se mettre en place progressivement grâce au processus de maturation, étape essentielle à la. La phase de maturation indispensable allonge la durée de l'immobilisation de la viande, donc son coût de stockage et le développement des micro-organismes. En conséquence, la phase de maturation doit être menée de façon optimale, pas trop courte afin de produire une viande tendre, mais pas trop longue non plus pour ne pas avoir une viande chère et de mauvaise qualité hygiénique. Le processus de maturation est caractérisé entre autre par l'action des protéases endogènes du muscle et débute dès la mort de l'animal (Ouali 1991). Les effets ne sont pas visibles tout de suite car cachés par l'évolution de la *rigor mortis*. C'est après la rigidité cadavérique maximale que les effets se feront sentir.

La tendreté est également dépendante des méthodes de préparation de la viande (découpe, cuisson) qui ne seront pas expliquées ici.

Afin d'étudier la tendreté des viandes, encore faut-il pouvoir l'évaluer avec objectivité. De nombreux tests mécaniques sont disponibles pour réaliser ce type d'étude après l'abattage et la découpe de l'animal, par exemple : le test de cisaillement Warner-Bratzler, le test de compression, de tension, de morsure, la pénétrométrie, et le découpage par lames multiples (Lepetit et Culioli 1994). Or, la texture du muscle est la résultante de nombreux facteurs, et son évaluation ne peut être réduite à un seul paramètre mécanique. C'est pourquoi dans de nombreuses études, le test sensoriel, faisant intervenir un jury de dégustation entraîné à juger de la qualité des viandes dont la tendreté, est employé en complément des tests mécaniques. L'évaluation de la tendreté effectuée par ces tests dans différentes équipes est à nuancer en fonction de la préparation des échantillons. Selon les pays, les échantillons étudiés sont cuits avec une température à cœur de 55-60°C en France (Dransfield *et al* 2003) et à 70°C aux USA (Wheeler *et al* 1998).

Le test de Warner-Bratzler (WB) est le principal test mécanique utilisé internationalement pour suivre l'évaluation de la tendreté (Lepetit et Culioli 1994). Il s'agit d'appliquer une force de cisaillement sur un échantillon, ce qui fait intervenir la résistance du tissu conjonctif (Lepetit et Salé 1985). Différents protocoles et matériels existent, mais Wheeler *et al* (1997) ont standardisé ce test. Ce dernier consiste à découper dans l'échantillon à analyser 6 cylindres au maximum d'un diamètre de 1,27cm (Figure 28A). Ceux-ci sont découpés dans l'axe longitudinal aux fibres musculaires. Ensuite, une force de cisaillement est exercée sur le cylindre, de manière perpendiculaire à l'orientation des fibres. Cette force est produite par une lame de 1,016mm d'épaisseur, dont le côté tranchant est en forme de V inversé, d'un angle de 60° (Figure 28B). Le cisaillement est appliqué au centre du cylindre par un appareil Warner-Bratzler dont la vitesse de cisaillement est réglable (Figure 28C). La force nécessaire au cisaillement de l'échantillon est exprimée en kg/cm².

Le deuxième test mécanique le plus utilisé est le test de compression (Lepetit et Salé 1985). Il s'applique sur un échantillon de 1 x 1 x 1,5cm, maintenu entre deux plaques longitudinales parallèles. Les fibres musculaires sont orientées dans le sens des plaques. La compression appliquée permet de mettre en valeur les caractéristiques de la structure myofibrillaire.

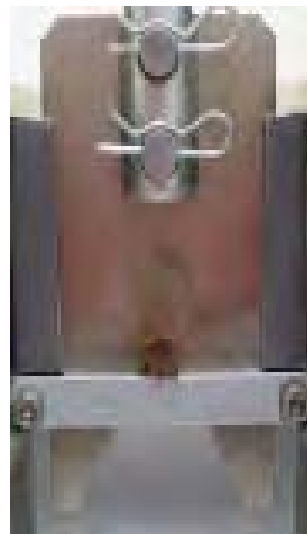
Le test sensoriel fait appel à un jury de dégustation entraîné à l'évaluation de la tendreté de la viande bovine. Le nombre de personnes est variable selon les études, il est en général de



A



B



C

Figure 28. Test de Warner-Bratzler

A. Lame en V inversé de 1,016mm utilisée pour le test.

B. Echantillons de 1,27cm de diamètre découpés dans le steak à analyser.

C. Mise en place du test sur un échantillon.

Wheeler et al, 1997

6 à 12. Ces personnes notent les échantillons en fonction de leur tendreté, dont l'échelle diffère selon les études. D'après la méthode décrite par Otremba *et al* (1999), les échantillons sont des cubes découpés dans les steaks à analyser. Ils sont présentés aux membres du jury dans un ordre aléatoire. Entre chaque échantillon, les personnes boivent de l'eau déminéralisée et mangent des crackers non salés afin d'éliminer toute interférence entre les échantillons.

L'évaluation de la tendreté est une problématique en ce sens que de nombreux tests différents existent. Le test WB est corrélé avec la dureté sensorielle de la viande ($r = 0,82$) et est donc inverse à la tendreté (Peachey *et al* 2002). Comme le test de compression, le test WB est mécanique et donc ne reflète pas forcément la sensation de tendreté perçue par les sens humains. C'est pourquoi le jury de dégustation est utilisé. Mais une évaluation purement humaine est sujette à une grande variation car la tendreté peut être perçue différemment par deux personnes pour un même échantillon. Les deux types de tests sont souvent employés de concert afin d'avoir une évaluation la plus juste possible de la tendreté de la viande. La corrélation entre ces deux tests est en moyenne de $-0,60$, en allant de $-0,26$ à $-0,95$ (Whipple *et al* 1990, Shackelford *et al* 1999, Peachey *et al* 2002, Rhee *et al* 2004, Wheeler *et al* 2004). Ces corrélations varient notamment en fonction du type de muscle analysé et des incohérences peuvent apparaître, soit à cause du manque de répétabilité dû aux propriétés du muscle considéré, ou à la variabilité des notes décernées par un jury de dégustation (Wheeler *et al* 1997). Les tests demandent une quantité importante de viande, ce qui peut être préjudiciable pour le volume d'échantillons à analyser.

III.5 Caractéristiques de la tendreté

La tendreté est dépendante de plusieurs composantes : les fibres musculaires, le collagène, les lipides intramusculaires, et les systèmes protéasiques. Ces derniers interviennent lors de la transformation *post-mortem* du muscle en viande à l'abattoir et aussi sur les caractéristiques de la viande en bouche. L'importance de leur contribution à la tendreté n'est pas la même selon les muscles. Certains facteurs peuvent même être favorables à la tendreté dans un muscle et être défavorables dans un autre (Koohmaraie *et al* 2002).

III.5.1 Les fibres musculaires

Les protéines myofibrillaires influencent fortement la tendreté de la viande bovine (Koohmaraie *et al* 2002). Les différentes caractéristiques des fibres, au niveau de leur vitesse

de contraction et de leur métabolisme, produisent des effets différents sur la tendreté. Ces derniers varient en fonction du muscle, des animaux et des races, ce qui constitue un défi à l'établissement d'une définition claire et consensuelle de la contribution des fibres à la tendreté. Néanmoins, plusieurs points ont pu être dégagés à l'heure actuelle (Figure 29), même si certains d'entre eux sont sujets à débats et discussions, comme par exemple la surface des fibres et leur métabolisme (Renand *et al* 2001). La vitesse de maturation, processus essentiel dans l'établissement de la tendreté, est influencée par le métabolisme glycolytique ou oxydatif des fibres et par leur type contractile. En effet, l'étude de Ouali et Talmant (1990) montre que le rapport calpaïne / calpastatine est plus élevé dans les muscles à contraction rapide. Ainsi, la protéolyse est plus importante et donc la vitesse de maturation est plus grande.

Les travaux de Dransfield *et al* (2002, 2003) rapportent que la valeur du pH à 3 heures *post-mortem* explique 0,52 de la variation de la tendreté. En effet, ce dernier doit connaître une baisse modérée, pas trop rapide, pour que la tendreté soit jugée comme bonne. En conséquence, le potentiel glycolytique des fibres constitue un critère important dans l'évolution du pH à 3 heures *post-mortem*. Les muscles les plus glycolytiques peuvent présenter une chute de pH trop rapide et sont susceptibles d'être plus défavorables à la tendreté sur ce critère par rapport aux muscles plus oxydatifs. Par exemple, le muscle *Longissimus thoracis*, plus oxydatif et plus tendre, est caractérisé par une valeur de pH plus élevée (6,4) à 3 heures *post-mortem* alors que le *Semitendinosus*, plus glycolytique et plus dur, présente une valeur de pH plus faible (6,0). Ainsi, une baisse de 0,4 unité de pH a pour conséquence une chute de 0,7 unité de score de tendreté. Toutefois, un contrôle du pH dans la carcasse n'est pas envisageable en raison des vitesses de refroidissement différentes dans la carcasse ainsi que des différentes vitesses de chute du pH dans les muscles.

Une corrélation ($r = 0,53$) entre la taille des fibres et la tendreté a été observée à 24 heures *post-mortem* (Crouse *et al* 1991). Cette corrélation devient faible après 14 jours de maturation. En fait, la taille des fibres est un facteur déterminant pour la tendreté précoce. Les effets de la protéolyse *post-mortem* plus tardive sont plus importants que ceux de la taille des fibres sur la tendreté. L'étude de Renand *et al* (1997) a montré que la surface des fibres musculaires est une caractéristique expliquant une variabilité génétique de 11% de la tendreté. Les animaux ayant des fibres de petite taille ont tendance à avoir une viande plus tendre ($r = -0,33$). Des résultats provenant d'équipes nord-américaines et danoises montrent également ce

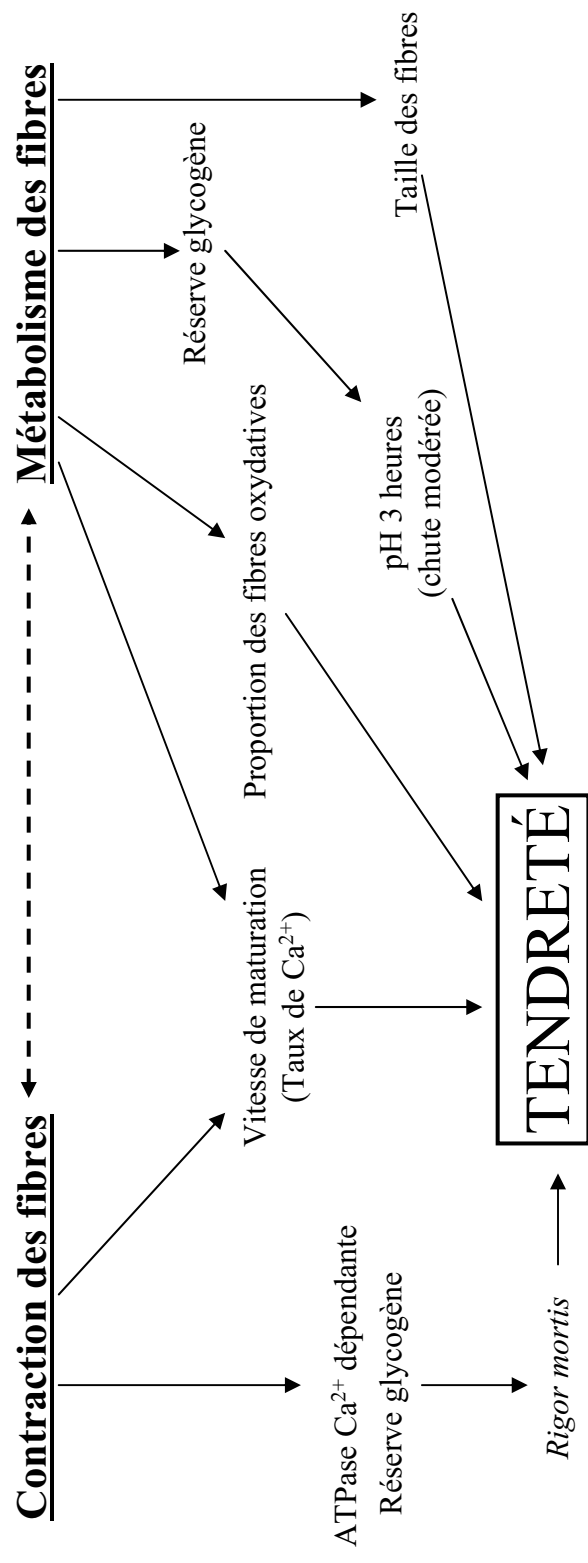


Figure 29. Caractéristiques des fibres influençant la tendreté

type de relation, mais de manière moins importante ($r = -0,11$). Sur ce critère, les fibres oxydatives sont donc plus favorables à la tendreté que les fibres glycolytiques. En effet, les fibres oxydatives ont un diamètre plus faible que les fibres glycolytiques car celui-ci est limité par la diffusion de l'oxygène, plus efficace dans une fibre de petite taille que de grande taille (Maltin *et al* 2003). Cependant, pour certaines études dont celle de Dransfield *et al* (2003), le facteur « taille des fibres » est trop peu important en comparaison des facteurs « pH » et « type métabolique ».

Le type métabolique des fibres musculaires influe également sur la tendreté. Mais la nature de la relation entre type métabolique et tendreté est complexe.

Ainsi, les études de Zamora *et al* (1996) montrent que la résistance des muscles est corrélée positivement ($r = +0,65$) avec l'activité de l'enzyme oxydative citrate synthase. Donc, plus un muscle est rouge oxydatif, plus sa dureté est importante après maturation. Les études réalisées par Renand *et al* (1997, 2001) montrent également que plus le métabolisme du muscle est de type oxydatif, plus la viande est dure. Ceci est en accord avec les résultats sur les muscles des bovins culards, dans lesquels plus un muscle est glycolytique, plus la viande est tendre.

Mais contrairement à ces résultats, Maltin *et al* (1998) montrent une corrélation positive ($r = 0,48$) entre la tendreté et la proportion de fibres SO, et une corrélation négative ($r = -0,38$) entre la tendreté et la proportion de fibres FG. Maltin *et al* (1998) mettent en avant l'importance du turn-over protéique dans les fibres à métabolisme oxydatif pour expliquer une plus forte dégradation des protéines myofibrillaires, et donc une tendreté plus prononcée. L'étude de Strydom *et al* (2000) trouve une corrélation positive entre la fragmentation myofibrillaire et les fibres rouges ($r = 0,48$) d'une part, et les fibres intermédiaires ($r = 0,83$) d'autre part, et de la même manière, une corrélation négative entre la fragmentation myofibrillaire et les fibres blanches ($r = -0,72$). Ces résultats sur la nature plus importante de la dégradation myofibrillaire dans les fibres oxydatives sont différents de ceux trouvés par Ouali et Talmant (1990), qui montrent que le taux de maturation est plus important dans les fibres glycolytiques que oxydatives. L'étude de Dransfield *et al* (2003) arrive également à montrer que les viandes tendres possèdent un pourcentage plus élevé de fibres SO que de fibres FOG. Maltin *et al* (2003) expliquent que les fibres anaérobies sont défavorables à la tendreté car les réserves importantes de glycogène induisent une chute trop importante du pH due à une accumulation trop élevée du lactate.

Cependant, les différents résultats doivent être pondérés par les différences entre les systèmes de production étudiés. Ainsi, les études menées par Maltin *et al* (2003) et Strydom *et al* (2000) portent sur des races anglaises et croisées pour la première, et sud-africaines pour la deuxième. Les études de Zamora *et al* (1996) et Renand *et al* (2001) portent sur des taurillons Charolais. Quant à Dransfield *et al* (2003), son étude a porté sur 4 races : Aubrac, Charolaise, Limousine, Salers, et sur des taurillons et des vaches d'âges différents. Ainsi, les relations entre métabolisme des fibres et tendreté sont différentes selon les systèmes de production. De plus, l'impact du type métabolique des fibres sur la tendreté peut changer du tout au tout en fonction du muscle. Ainsi, Maltin *et al* (2003) montrent que plus le muscle *Longissimus lumborum* est oxydatif, plus il est tendre, ce qui est l'inverse du muscle *Vastus lateralis*. L'étude de Picard *et al* (2007) montre le même type de résultat, c'est-à-dire que plus le muscle *Longissimus thoracis* est oxydatif, plus il est tendre. C'est l'inverse pour le *Semitendinosus* ; plus il est glycolytique, plus il est tendre.

La nature exacte de la relation entre type métabolique et tendreté est donc très complexe, car sans doute régie par un grand nombre de facteurs dont beaucoup sont encore inconnus. La contribution du type métabolique à la tendreté va évoluer en fonction du système de production (races utilisées, méthodes d'élevage), ce qui se traduit par une hétérogénéité des résultats en fonction des équipes de recherche. De plus, il a été montré qu'au sein des mêmes animaux, la contribution du métabolisme à la tendreté est différente selon les muscles. Renand *et al* (2001) signalent tout de même l'existence d'un consensus pour dire que le métabolisme oxydatif serait plus favorable à la tendreté.

D'un point de vue général, la contribution de tous ces facteurs à la tendreté, connus et inconnus, est nuancée en fonction du type de muscle, de l'animal, de la race et du mode d'élevage. La différence de contribution des caractéristiques des fibres et des autres constituants du muscle (collagène, lipides, protéases) est difficilement distinguable, car tous interagissent ensemble et varient en fonction du muscle notamment.

III.5.2 Le collagène

L'épimysium est retiré généralement lors des opérations de découpe de la viande, et ne constitue pas un facteur important dans la tendreté. Le tissu intramusculaire (perimysium et endomysium) joue donc un rôle clé dans la qualité de la viande puisqu'il est retrouvé dans la viande après découpe.

L'étude de Lepetit (2004) a montré que le collagène intervient positivement dans la tendreté par sa solubilité, et négativement par sa teneur dans le muscle. De plus, l'importance du collagène dans la tendreté est variable en fonction de la température de cuisson de la viande. La solubilité du collagène augmentant avec la température, son importance est moins forte dans les études nord-américaines où la viande est cuite à une température de 10°C supérieure aux études françaises.

D'ailleurs, les différents morceaux de la carcasse sont classés en trois groupes selon leur teneur en collagène : les morceaux à griller, à braiser ou à bouillir. Lorsque le collagène est chauffé, il se contracte et se dénature aux alentours de 58-65°C pour se transformer en gélatine insoluble, par rupture des liaisons intramoléculaires d'abord, puis des liaisons intermoléculaires si la cuisson s'intensifie (Lepetit 2004). Quelques différences existent dans la température de dénaturation entre les différents types de collagène. En conséquence, les morceaux contenant beaucoup de collagène nécessitent un temps et une température de cuisson plus importants afin de transformer le collagène en gélatine. A l'inverse, des morceaux pauvres en collagène peuvent être cuits rapidement.

Les liaisons pyridinium et la quantité de collagène sont déterminantes pour la qualité de la viande, en particulier pour la tendreté. Ainsi, les muscles les moins tendres, comme le *Semimembranosus*, présentent une concentration de collagène (3%) et un nombre de liaisons pyridinium élevés (McCormick 1999). A l'inverse, un muscle tendre comme le *Longissimus dorsi*, présente une concentration en collagène (1,86%) et un nombre de liaisons pyridinium plus faible.

Mais certains muscles comme le *Gluteus medius* ont beaucoup de collagène (2,77%) et peu de liaisons pyridinium. Le muscle *Psoas major* a peu de collagène (1,41%) et beaucoup de liaisons pyridinium. Ces deux muscles présentent une bonne tendreté. Il en a été conclu que la concentration en collagène et le nombre de liaisons pyridinium ont un effet additif en diminuant la tendreté (McCormick 1999).

La solubilité du collagène décroît lorsque l'âge de l'animal augmente, en raison de l'augmentation du nombre de liaisons pyridinium, et a pour conséquence une viande moins tendre. Les femelles présentent une teneur en collagène plus faible que les mâles castrés, eux-mêmes en possédant moins que les mâles entiers. Sur ce critère, la viande est donc plus tendre chez les femelles, puis les bœufs et enfin les mâles entiers, à même âge (Hocquette *et al* 2005a).

Le collagène n'étant pas ou très peu affecté par les protéases, la teneur en collagène du muscle définit une dureté de base qui limite la tendreté maximale du muscle. Cependant le

collagène de type III est plus sensible aux protéases. Sa proportion dans le muscle influe sur la tendreté (Monin 1991).

Les types de collagène XII et XIV (présents dans le pérимysium) diminueraient la solubilité du collagène total (Listrat *et al* 2000), et donc la tendreté. Ces types de collagène « mineurs » joueraient un rôle important dans les propriétés physiologiques du collagène.

Cependant, il est difficile de relier précisément l'apport du collagène dans la tendreté car deux muscles présentant une teneur, composition et solubilité identique en collagène peuvent avoir des tendretés différentes en raison de la résistance des fibres musculaires qui s'oppose à la contraction du collagène (Lepetit 2004).

III.5.3 Les lipides

Les lipides sont présents sous la forme de triglycérides (acides gras hydrophobes saturés) majoritaires et de phospholipides (lipides membranaires insaturés) (Renand *et al* 2001).

Diverses études ont montré qu'il existe une corrélation positive entre la teneur en lipides et la tendreté, comme celle de Picard *et al* (2006) ($r = + 0,23$) et Renand *et al* (1997) ($r = + 0,19$). La couche de gras sous-cutané protège le muscle de la contracture au froid, et maintient la température musculaire à un niveau favorable à la maturation (Geay *et al* 2001). La diminution du gras intramusculaire a un impact négatif sur la tendreté, bien qu'il n'explique que 3 à 10 % de la variabilité de la tendreté.

La présence d'adipocytes abaisse la dureté d'un muscle en produisant un effet lubrificateur durant la mastication, ce qui réhausse la sensation de tendreté perçue par le consommateur (Renand *et al* 2001).

III.5.4 Les systèmes protéasiques

Les systèmes protéasiques interviennent lors de la phase d'attendrissage de la viande appelée maturation, qui constitue donc un processus essentiel dans l'amélioration progressive de la tendreté après la *rigor mortis* des muscles. Cette rigidité survient 24 à 48 heures après l'abattage. C'est ensuite que débute la phase de maturation, sur des carcasses correctement refroidies à une température inférieure ou égale à 7°C. La maturation est un processus multifactoriel très complexe essentiellement enzymatique, résultant donc de l'action de protéases endogènes sur les protéines myofibrillaires, fragilisant la structure musculaire. Le processus de maturation varie en vitesse et en intensité entre muscles d'un même animal, en relation avec le type contractile et métabolique des muscles (Ouali 1991). Les systèmes

protéolytiques vont dégrader les protéines myofibrillaires et du cytosquelette. Ils vont ainsi briser les liens inter et intra myofibrilles, les liaisons myofibrille / sarcolemme, et l'attachement des cellules musculaires à la lame basale. Il s'agit d'une protéolyse ménagée qui va détendre progressivement le muscle jusqu'à une valeur de tendreté maximale. Le processus de protéolyse des protéines myofibrillaires est un phénomène clé dans l'établissement de la tendreté. Cependant celui-ci est variable d'un animal à un autre. L'oxydation des protéines va moduler la protéolyse. En effet, les protéines oxydées forment des agrégats, ce qui décroît leur sensibilité aux protéases (Morzel *et al* 2006).

La variabilité du processus de maturation peut résulter des différences de concentration d'enzymes et du rapport enzymes / inhibiteurs entre muscles. La croissance musculaire est augmentée lorsque l'activité protéolytique est réduite par l'action des inhibiteurs. Ainsi, le taux d'inhibiteurs de protéases pourrait constituer un bon indice dans l'évaluation de la tendreté (Sentandreu *et al* 2002). Les protéases impliquées dans la tendreté sont les calpaïnes, les cathepsines, le protéasome, les matrice metallopeptidase, et les peptidases à sérine. Les caspases sont également impliquées, en tant qu'effectrices de l'apoptose.

Etant donné que les calpaïnes auraient un rôle très important dans la mise en place de la tendreté *post-mortem*, elles sont les cibles de nombreuses études. Certaines ont ainsi rapporté que la dégradation des disques Z, réaction corrélée positivement à la tendreté, est due à l'activité des calpaïnes. Certains auteurs n'hésitent pas à rendre les calpaïnes responsables de 95% de l'activité protéolytique totale lors de la mise en place de la tendreté (Koohmaraie et Geesink 2006). C'est ainsi que le système calpaïnes/calpastatine serait un bon marqueur de la tendreté de la viande, et plus précisément le rapport calpaïne / calpastatine. A l'instar des calpaïnes, le protéasome 20S cause une dégradation des disque M et Z. Il serait donc également un acteur important de la protéolyse (Houbak *et al* 2008).

Le rôle des cathepsines dans la mise en place de la tendreté est sujet à controverse. En effet, l'activité de ces enzymes ne permet pas d'expliquer la variabilité de la tendreté, contrairement aux calpaïnes. De plus, les cathepsines sont contenues dans le lysosome et n'ont pas accès aux protéines myofibrillaires. Mais certaines études ont montré qu'après une maturation de 14 jours, la membrane du lysosome se rompt progressivement, libérant les cathepsines. Ainsi, la fraction soluble est enrichie de ces enzymes. La présence des cystatines dans le cytoplasme inhibe l'activité des cathepsines ainsi libérées. C'est pourquoi le rapport cathepsines / cystatines serait un bon indice de l'activité de ces enzymes. L'activité de certaines cathepsines, comme les B, H et L, serait corrélée à la tendreté. Des incubations de

fibres musculaires dans des extraits de lysosymes ont montré que l'actine et la myosine sont partiellement dégradées au bout de 7 à 10 jours *post-mortem*. Ainsi, tout comme les calpaïnes, le rapport cathepsines / cystatines pourrait constituer un marqueur de la tendreté. D'une manière plus générale, les changements de la structure myofibrillaire lors de la protéolyse ne peuvent être expliqués par un seul système protéolytique. C'est pourquoi une action synergique des calpaïnes et des cathepsines est envisagée lors de cette phase de maturation.

Etant donné que le collagène ne subit que peu de changements durant la maturation, les MMPs ont été peu étudiées dans le cadre des sciences de la viande. Cependant, d'autres constituants de la matrice extracellulaire des fibres musculaires, comme les laminines, fibronectines et dystroglycanes, pourraient être affectés par les MMPs. L'étude de ces protéases et de leurs inhibiteurs permettrait d'en savoir plus sur les événements *post-mortem* ayant lieu dans la fibre musculaire.

La présence des différents types de protéases à sérine est complexe à identifier. Leur rôle dans la mise en place de la tendreté reste encore à préciser, ce qui fait l'objet d'études en cours actuellement.

Les protéases jouent ainsi un rôle critique dans la mise en place de la tendreté, et particulièrement le système calpaïne / calpastatine. Mais d'autres systèmes protéolytiques, comme les cathepsines par exemple, restent moins étudiées et pourtant ces systèmes sont impliqués dans la mise en place de la tendreté. D'une manière générale, l'efficacité d'action de ces systèmes protéolytiques constitue un bon indice de la mise en place de la tendreté (rapidité, amplitude). Plus précisément, c'est le rapport enzymes / inhibiteur qui est déterminant pour la protéolyse lors de la maturation.

La maturation est un processus essentiel à la tendreté de la viande, dépendant à la fois de facteurs biologiques (la nature des myofibres, le taux d'enzymes / inhibiteurs), mais également de facteurs technologiques (température des carcasses). Il s'agit en outre d'un processus très complexe dont le déroulement exact est l'objet de nombreuses études à l'heure actuelle.

III.5.5 L'apoptose

Lors de l'abattage, l'exsanguination de la carcasse prive les cellules de nutriments et d'oxygène. Les cellules s'engagent alors dans la voie de mort programmée. L'apoptose serait donc un processus intervenant dans la mise en place de la tendreté (Ouali *et al* 2006). En

effet, les premières protéases actives lors de l'abattage seraient les caspases, dont la fonction première est de cliver les protéines cellulaires *in vivo*. Leurs substrats dans la cellule seraient nombreux (de l'ordre de centaines de protéines différentes dégradées), ce qui est comparable à ce qui a été trouvé pour les calpaïnes, enzymes dont le rôle est déterminant dans la tendreté. Les caspases pourraient donc dégrader des protéines clés dans l'organisation structurale des myofibrilles, conjointement avec d'autres protéases, et donc ainsi jouer un rôle de premier plan dans la mise en place précoce de la tendreté, avant les calpaïnes. Ainsi, il existerait une étape supplémentaire dans l'évolution de la tendreté, avant la phase de *rigor mortis*, durant laquelle l'apoptose a un rôle prépondérant (Figure 30). La part de l'apoptose dans la tendreté est sujette à de nombreux débats à l'heure actuelle, en opposition notamment avec l'idée d'un rôle très largement dominant du système calpaïne dans la maturation.

III.5.6 Conclusion

La tendreté de la viande dépend donc de facteurs intrinsèques au muscle, tels que la nature des fibres et du collagène, du taux de lipides et du rapport protéases / inhibiteur. Elle va dépendre également de facteurs technologiques appliqués lors de la transformation du muscle en viande à l'abattoir (refroidissement des carcasses) qui vont jouer durant la phase de maturation. Le facteur le plus influant sur la tendreté est néanmoins le type de muscle.

L'évolution de la tendreté est donc un concept difficile à comprendre précisément et objectivement à l'heure actuelle. Les recherches portant sur la tendreté visent à mieux comprendre la mise en place de cette qualité, notamment par une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires en jeu. Ainsi, les connaissances générées par ces recherches permettront de proposer aux professionnels des outils pour contrôler et agir sur la tendreté du vivant de l'animal, permettant la production d'une viande de tendreté garantie. Des outils génétiques permettront de sélectionner les lignées, et ainsi d'améliorer le patrimoine génétique des races bovines en vue de produire une viande plus tendre.

Il est donc nécessaire d'étudier et de valider des marqueurs génétiques révélateurs des caractéristiques de la tendreté évoquées dans cette première partie.

IV Génomique et tendreté

La tendreté est donc la résultante de l'expression de nombreux caractères phénotypiques, comme il a été montré dans la première partie. Afin d'étudier et de déterminer ces caractères,

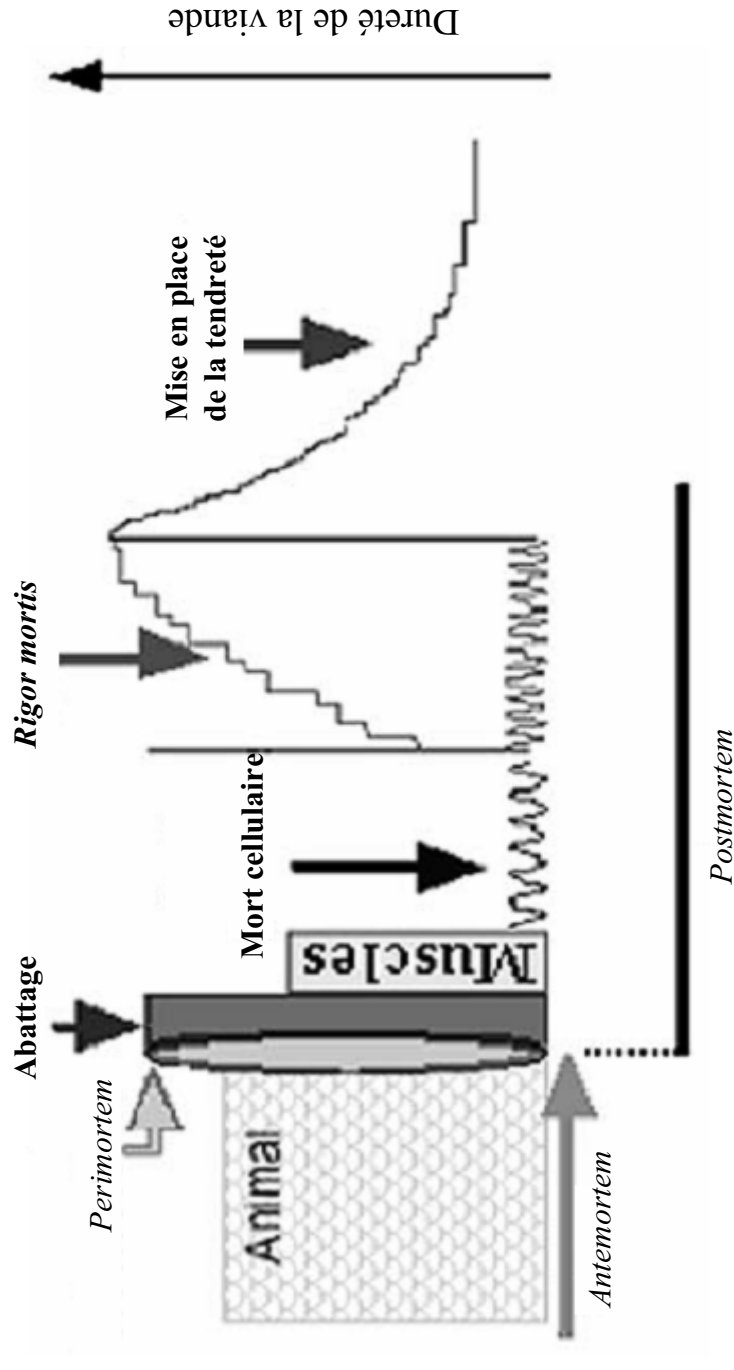


Figure 30. Les différentes phases de l'évolution de la dureté du muscle au cours du temps après l'abattage.

L'étape précoce de la mort cellulaire a un rôle prépondérant dans la mise en place de la tendreté alors que les systèmes protéolytiques connus ne fonctionnent pas encore.

Adapté de Ouali, A. (2006).

de nombreuses études sont en œuvre à l'heure actuelle. Parmi elles, des études de génomique contribuent à l'évolution des connaissances sur la tendreté.

La génomique peut être définie comme étant la science qui étudie la structure et les fonctions des gènes, tandis que la génétique étudie la transmission des caractères (Hocquette *et al* 2007b). Les premières études génétiques ciblaient des gènes isolés. Leurs résultats étaient donc limités à des caractères phénotypiques simples. Avec les progrès réalisés ces dernières années (PCR, séquençages, puces...) l'analyse en série de plusieurs centaines de gènes peut être accomplie. Cela permet d'obtenir des résultats importants et d'avoir une vue globale d'un processus aboutissant à un phénotype complexe : c'est l'ère de la génomique.

IV.1 Le génome bovin

Le séquençage du génome bovin a été initié en 2003 par le Human Genome Sequencing Center du Baylor College of Medicine à Houston (Texas, USA) et a été publié le 24 Avril 2009 (Elsik *et al* 2009). L'ADN provient du sang prélevé sur un taureau de race Hereford, Domino, et sur sa fille, une vache Hereford, Dominette. La taille du génome est estimée à 3000 Mb, organisé en 29 paires d'autosomes et une paire de gonosomes.

A l'heure actuelle, le génome bovin a été séquencé et assemblé, mais il n'est que peu annoté. Une quatrième version est disponible à ce jour (version Btau_4.2) depuis le 15 Avril 2009. L'assemblage couvre 7,1 équivalents du génome bovin. Les données peuvent être consultées sur le site du NCBI :

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genomeprj&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=10708).

Le principal intérêt de disposer du génome bovin est de pouvoir envisager d'effectuer des progrès rapides dans les domaines agronomiques, en ce qui concerne par exemple les qualités sensorielles de la viande mais aussi les maladies du bovin, en passant par une sélection génétique des reproducteurs. Mais l'intérêt du séquençage du génome bovin ne s'arrête pas là. En effet, les bovins étant proches des ovins et des porcins, le génome bovin pourrait servir de modèle de base pour l'étude de ces animaux d'élevage. Mais encore, le bovin peut être utilisé comme organisme modèle dans l'étude des mammifères, et ainsi contribuer *in fine* à l'enrichissement des connaissances concernant *Homo sapiens*. Des progrès en santé humaine, notamment sur les sujets comme l'obésité, le diabète ou encore des maladies telles qu'Alzheimer ou Parkinson, sont ainsi envisagés. Des programmes de séquençages partiels d'autres races bovines, comme la Limousine ou la Holstein, ont été entrepris pour identifier

des polymorphismes. Des banques d'ADNc bovins sont disponibles, notamment pour le muscle squelettique (Sudre *et al* 2005).

IV.2 Marqueurs de la tendreté

Un marqueur biologique peut être défini de façon générale comme étant une molécule biologique associée à un phénotype particulier, et qui peut être aisément utilisée afin de visualiser ce dernier. Deux types de marqueurs biologiques peuvent être distingués : les marqueurs génétiques et protéiques. Les marqueurs protéiques seront abordés dans une autre partie.

Un marqueur génétique est un segment d'ADN aisément repérable, soit par la nature même de sa séquence, soit par le produit de son expression. Un marqueur génétique est donc un *loci* de l'ADN existant sous plusieurs formes ou allèles au sein d'une espèce, ce qui donne le polymorphisme (Schibler *et al* 2000).

Il existe deux catégories de marqueurs :

- Les motifs répétés, qui consistent en des variations du nombre de répétitions (exemple des minisatellites et des microsatellites).
- Les mutations ponctuelles ou SNP (Single Nucleotide Polymorphism, un tous les kb chez les mammifères) qui consistent en des changements de quelques bases de la séquence ADN.

De multiples techniques de génomique sont disponibles afin d'analyser ces marqueurs. Dans les recherches portant sur les caractères phénotypiques, l'identification de gènes impliqués dans l'expression des caractères d'intérêt est d'un atout important. De tels gènes sont qualifiés de QTL (Quantitative Trait *Loci*) lorsque leur variation allélique est associée à un caractère phénotypique quantitatif.

L'identification de marqueurs et de QTL constitue un intérêt de taille pour la filière d'élevage car la variabilité génétique peut être exploitée afin de sélectionner les meilleurs animaux selon leurs performances et améliorer la race. Des résultats ont été obtenus pour l'identification de gènes impliqués dans les qualités sensorielles des viandes, notamment le persillé, mais aussi concernant la tendreté.

Différentes études ont mis en évidence des polymorphismes dans des gènes dont l'expression agit sur la tendreté. Ces gènes ont été proposés comme étant des marqueurs et certains polymorphismes sont ainsi exploités commercialement. La recherche de gènes et la détermination de leur polymorphisme est un sujet de recherche actif et soumis à une forte

concurrence entre les entreprises pour exploiter au mieux ces avancées pour en faire profiter la filière viande.

IV.2.1 Marqueurs basés sur des polymorphismes

IV.2.1.1 CAPN1

Le gène CAPN1 code une protéase à cystéine, la μ -calpaïne. Cette protéine dégrade les protéines myofibrillaires durant la phase de protéolyse lors de la maturation (voir la partie sur la tendreté). Des études ont vérifié si le gène CAPN1 pouvait constituer un bon marqueur de la tendreté (Page *et al* 2002). Ce gène, localisé près des télomères du chromosome BTA29, est organisé en 22 exons et 21 introns pour une taille de 30kb. Tous les exons ont été séquencés pour étudier les variations alléliques chez une race hybride Piémontaise X Angus. Cela a abouti à l'identification de 5 SNP dans les exons. Deux sont responsables d'un changement d'acide aminé dans la séquence protéique. Le premier concerne un codon GCC (alanine) en codon GGC (glycine) dans l'exon 9, pour l'acide aminé 316. Le second changement est constitué du codon GTC (valine) en codon ATC (isoleucine) dans l'exon 14, pour l'acide aminé 530. Des analyses ont montré qu'un allèle (allèle 1) contient l'alanine en position 316 (A³¹⁶) et la valine en position 530 (V⁵³⁰) tandis qu'un second allèle (allèle 2) contient la glycine en position 316 (G³¹⁶) et l'isoleucine en position 530 (I⁵³⁰). L'allèle 1 a été associé à une augmentation de la tendreté. Les vaches de race Limousine séquencées dans cette étude ont l'allèle 2, défavorable à la tendreté (Page *et al* 2004).

Une étude menée par White *et al* (2005) a abouti à l'identification d'autres SNP au sein du gène CAPN1 dans des races de *Bos indicus*, les SNP trouvés par Page *et al* n'étant pas pertinents pour cette espèce. Trois marqueurs ont été identifiés : le marqueur 4751, 4753 et 530. Le marqueur 4751 est le plus corrélé à la tendreté et son utilisation avec le SNP316 de Page *et al* (2002) est recommandé par White *et al* (2005), à la fois chez *Bos indicus* et *Bos taurus*.

L'étude de Barendse *et al* (2007) pondère l'implication de ces marqueurs de la tendreté en fonction des races utilisées. Selon cette étude, la pertinence des SNP est race-spécifique. Ainsi, les polymorphismes détectés et recommandés en utilisation commerciale sont significatifs dans des races Belmont Red ou Angus, mais pas en ce qui concerne les races bovines purement européennes.

IV.2.1.2 CAST

Le gène CAST code pour la calpastatine, un inhibiteur de la μ - et la m-calpaïne, qui sont deux enzymes impliquées dans la protéolyse *post-mortem* et donc la tendreté. Ainsi, l'activité de CAST a été corrélée à une réduction de la tendreté de la viande (Schenkel *et al* 2006). Ce gène CAST a été localisé dans le chromosome BTA7.

Il existe un polymorphisme en position 257 du gène CAST. Il s'agit d'une transversion G/C. L'étude menée par Schenkel *et al* (2006) a montré qu'il existe une relation entre la tendreté et la nature des allèles pour le gène CAST. Ainsi, à 21 jours *post-mortem*, sur le muscle *Semitendinosus*, les homozygotes CC pour le gène CAST présentent une viande significativement plus tendre (62 %) que les homozygotes GG. Les hétérozygotes CG montrent une valeur de tendreté intermédiaire. Les animaux homozygotes CC seraient plus favorables à l'obtention d'une viande plus tendre. Les deux allèles C et G ne sont pas répartis de manière uniforme dans les populations. Ainsi, la fréquence de l'allèle C dans la race Limousine (28 animaux testés) est de 73,2 %. Ce biais de distribution de l'allèle dans une race à viande pourrait résulter des programmes de sélection employés de manière empirique par les éleveurs.

D'autres polymorphismes de type SNP ont été trouvés, notamment par l'étude de Barendse *et al* (2007). Le SNP en position 155 concerne une transition C vers T ce qui change l'acide aminé proline en leucine et donc la profil d'hydropathie de la protéine. Ce changement est associé à une variation de la tendreté. Un SNP en position 1487 concerne également une transition de C vers T, ce qui change l'acide aminé alanine en valine. Ce SNP est associé à une variation de la tendreté. D'autres SNP ont été identifiés, ayant des effets plus ou moins marqués sur la tendreté, en fonction de l'impact qu'ils produisent sur la protéine et sa fonction. En effet, les différents domaines de la calpastatine n'ont pas la même incidence sur le mécanisme d'inhibition de la calpaïne, et des SNP affectant le domaine d'interaction calpaïne-calpastatine auront un effet fort sur la tendreté, tandis que les SNP sur les domaines charnières de la calpastatine n'auront pas ou peu de conséquences.

IV.2.1.3 LOX

Le gène LOX, positionné sur le chromosome BTA7, code pour une lysyl-oxidase. Celle-ci forme des liaisons entre les fibrilles de collagène, sur les résidus lysines et hydroxylysines. La nature et la quantité de ces liaisons sont des facteurs intervenant dans la tendreté de la viande en modifiant la solubilité du collagène (voir la partie sur la tendreté). D'après Barendse (2002), le polymorphisme de ce gène constitue un marqueur de la tendreté. Il existe deux

allèles du gène LOX retrouvés dans toutes les races de cette étude (Angus, Belmont Red, Brahman, Hereford, Santa Gertrudis, Shorthorn) à des fréquences différentes. Les individus hétérozygotes montrent des valeurs de tendreté extrêmes, ce qui suggère que ce locus est dominant.

IV.2.1.4 Tests commerciaux de la tendreté

Suite aux études ayant identifié des polymorphismes dans des gènes de la tendreté, des sociétés ont mis au point des tests permettant de prédire la tendreté de la viande produite par les animaux, à partir du génotype de ces derniers.

IV.2.1.4.i Test GeneSTAR Tenderness

C'est un test mis au point par les compagnies Bovigen (USA) et CatapultGenetics (Nouvelle-Zélande).

Ce test de tendreté utilise 3 SNP. Le premier, CAST-T1, est un SNP en position 2959 dans la région 3'UTR du gène CAST, codant la calpastatine. Il concerne la transition G/A. Le second SNP, CAPN1-T2-316, est situé dans la base 5709 de l'exon 9 du gène CAPN1, codant la calpaïne. Il provoque une transversion G/C, ce qui change l'acide aminé 316 de la μ -calpaïne. Le troisième SNP, CAPN1-T3-4751, est situé dans un intron (entre l'exon 17 et 18) en position 6545 dans ce même gène. Il concerne la transition C/T.

IV.2.1.4.ii Test Igenity TenderGENE

C'est un test commercialisé par la compagnie Igenity (USA). Il utilise les mêmes SNP que GeneSTAR pour la μ -calpaïne (CAPN1-T2 et CAPN1-T3) mais utilise le SNP UoG-CAST, situé dans le gène CAST, en position 282 dans un intron (entre l'exon 5 et 6). Il s'agit d'une transversion G/C.

IV.2.1.4.iii Mode opératoire

Pour l'éleveur, il suffit de prélever des poils de la queue du bovin à analyser (Figures 31A et 31B). Il doit faire attention à bien conserver les bulbes des poils, car ce sont ces cellules qui serviront à l'analyse. L'éleveur collecte les poils, environ 15 à 30 par animal, dans un collecteur en plastique prévu à cet effet (Figure 31C). Les bulbes sont protégés par l'enveloppe plastique, qui est ensuite envoyée à la société commercialisant le kit. C'est elle qui se charge de l'analyse des génotypages.

Le protocole exact des génotypages réalisé par les sociétés n'est pas disponible. Cependant, la technologie des puces à ADN, permettant une analyse rapide d'un grand



A



B

Figures 31A et 31B. Prélèvement des poils de queue de bovin en vue de la réalisation d'un test de prédiction de la tendreté de l'animal (Igenity TenderGene).

Les bulbes doivent être présents.



Figure 31C. Protection des échantillons dans un collecteur en plastique.

Ce collecteur contenant notamment les bulbes sera envoyé à la société qui pratiquera les génotypages.

Les photographies proviennent du site d'Igenity au 03/01/08 (<http://www.igenity.com/Default.aspx>)

nombre d'échantillon, est certainement employée. Les résultats des génotypages sont envoyés à l'éleveur avec les prédictions sur la tendreté de la viande de l'animal (Figure 32), en utilisant une table de score en fonction des génotypes (Tableau 2).

L'étude de Van Eenennaam *et al* (2007) a montré que ces deux tests sont fiables en ce qui concerne le muscle *Longissimus lumborum* et pour les races Hereford, Brahman et les croisés Charolais X Angus. Mais cette étude précise également que les races, le contexte environnemental et les modes de production agissent sur l'impact des différents marqueurs sur le phénotype final. Les études de validation d'un test sur une race et dans un contexte donné, en l'occurrence aux USA, ne sont donc pas fiables pour les autres filières, par exemple la filière française. Cela montre la nécessité de développer des tests adaptés aux conditions d'élevage spécifiques du système français.

IV.2.2 Marqueurs basés sur la variation d'expression des gènes

IV.2.2.1 DNAJA1

L'étude de Bernard *et al* (2007) a utilisé la comparaison de profils d'expression de gènes par des puces à ADN. Les sondes étaient constituées par des oligonucléotides représentant des gènes humains et murins impliqués dans des processus normaux et pathologiques de muscles cardiaques et squelettiques. Les cibles étaient des ARNm provenant de muscles *Longissimus thoracis* de taurillons de races charolaise âgés de 15 et 19 mois. Ces ARN ont été rétrotranscrits au préalable. Les profils d'expression ont été comparés entre animaux présentant des valeurs extrêmes de tendreté. Cela a permis de révéler 615 gènes différenciellement exprimés. Parmi ceux-ci, le plus significativement relié à la tendreté est le gène DNAJA1. EN effet, celui-ci explique 63 % de la variabilité de la tendreté. Son expression est corrélée négativement à ce critère de qualité de la viande. Le gène DNAJA1 code pour une protéine du choc thermique de 40 kDa, Hsp40. Celle-ci est une co-chaperone d'une autre protéine du choc thermique de 70 kDa, Hsp70. Le complexe Hsp40 / Hsp70 inhibe directement le mécanisme d'apoptose en prévenant le transport de la protéine pro-apoptotique Bax à partir de la mitochondrie. Ce rôle de DNAJA1 dans la tendreté est en accord avec l'hypothèse que l'apoptose jouerait un rôle dans la mise en place de la tendreté, hypothèse qui a été exposée en première partie. DNAJA1 retardant l'apoptose, ce serait la raison pour laquelle les muscle LT les plus tendres présentent le profil d'expression de DNAJA1 les plus faibles.

555-555-5555

<u>Animal ID</u>	<u>Gender</u>	<u>Bar Code</u>	<u>Breed:</u>	<u>Test:</u>	<u>Result:</u>
1	M	17	Angus		
Reg No:	12345			Quality Grade	TG5=1 M2=2
Reg Name:	12345 go get em		Publication¹ ☐	Tenderness	CAST=1 CALP=2 T3 = 0
2	F	18	Angus		
Reg No:	56789			Quality Grade	TG5=2 M2=0
Reg Name:	56789 we got em		Publication¹ ☐	Tenderness	CAST=1 CALP=1 T3=2

DISCLAIMER: Bovigen, LLC has not made any and hereby excludes all warranties, terms conditions or undertakings, whether

Figure 32. Rapport des résultats des génotypages

Ce rapport est celui du test GeneSTAR comprenant un test de lipides (TG5 et M2) et le test Tenderness (CAST, CALP, T3).
L’importance de la tendreté prédite est symbolisée par le nombre d’étoiles.

Score	Genotype			WBSF Effect
	UoG-CAST1	CAPN310	CAPN4751	
10	CC	CC	CC	-2.27
9	CC	CG	CC	-1.95
8	CG	CC	CC	-1.85
7	CC	GG	CC	-1.83
7	CC	CC	CT	-1.55
7	CC	CG	CT	-1.55
7	CG	CG	CC	-1.53
7	GG	CC	CC	-1.44
6	CC	GG	CT	-1.23
6	CG	GG	CC	-1.21
5	CG	CC	CT	-1.13
5	CG	CG	CT	-1.13
5	GG	CG	CC	-1.11
4	CC	CC	TT	-0.83
4	CC	CG	TT	-0.83
4	CC	GG	TT	-0.83
4	CG	GG	CT	-0.81
4	GG	GG	CC	-0.79
4	GG	CC	CT	-0.72
4	GG	CG	CT	-0.72
3	CG	CC	TT	-0.42
3	CG	CG	TT	-0.42
3	CG	GG	TT	-0.42
3	GG	GG	CT	-0.40
1	GG	CC	TT	0.00
1	GG	CG	TT	0.00
1	GG	GG	TT	0.00

Tableau 2. Scores et effets sur la tendreté en fonction des génotypes

La table des scores provient de la société Igenity. L'impact des génotypes sur la résistance mécanique (WBSF Effect : Test Warner-Bratzler) est indiqué.

IV.2.2.2 Autres marqueurs génétiques de la tendreté

L'étude de Bernard *et al* (2007) a également mis en évidence d'autres gènes dont le profil transcriptomique est relié à la tendreté (Tableau 3).

C'est par exemple le cas du gène HSPB1, dont l'expression est négativement régulée à la tendreté. Ce gène code pour Hsp27, protéine du choc thermique impliquée dans la résistance au stress et l'organisation de l'actine. La sous-expression de cette protéine serait la cause d'une désorganisation des filaments d'actine, menant à leur dégradation. D'autres études ont montré que cette protéine Hsp27 peut interagir avec les protéines de la voie de l'apoptose, notamment dans l'activation des caspases (Herrera-Mendez *et al* 2006).

Le gène CRYAB est également sous-exprimé dans les lots de tendreté supérieure. Ce gène code pour l' α B-crystalline. Cette protéine partage une homologie avec la Hsp27, et appartient à la famille des protéines du choc thermique. L' α B-crystalline tient un rôle important dans la protection des filaments en prévenant leur agrégation. La sous-expression de cette protéine accélérerait la dégradation des filaments et par voie de conséquence, augmenterait la tendreté.

Ce sont au total 615 gènes différenciellement exprimés dans des lots de tendreté extrêmes qui ont été mis en évidence par cette étude. Tous n'ont pas été analysés et méritent des études approfondies.

Les différentes études montrent qu'il existe de nombreux marqueurs génétiques de la tendreté. Ces derniers sont cependant plus pertinents dans certaines races que dans d'autres, en raison du génotype de chaque race, mais également des modes d'élevage qui modifient *in fine* l'expression génétique. C'est pourquoi il est important de montrer des polymorphismes spécifiques dans nos races françaises afin que la filière viande bénéficie des mêmes avancés en terme de tests de prédiction de la tendreté que les australiens et les américains ont mis en place pour leur filière.

La détection des marqueurs de la tendreté est complétée notamment par des analyses protéomiques.

V La protéomique et la tendreté des viandes

V.1 Définition

La protéomique est l'analyse du contenu protéique exprimé par un génome. Un protéome est l'ensemble des protéines présentes dans une cellule ou un tissu à un moment donné. La

<u>Gène</u>	<u>Nom</u>	<u>Rôle dans la tendreté</u>
<i>Cbr2</i>	Carbonyle réductase 2	Positif
<i>CPT1B</i>	Carnitine Palmitoyltransférase 1B	Positif
<i>Cyp2c50</i>	Cytochrome P450 polypeptide 50	Positif
<i>LAMA3</i>	Laminine $\alpha 3$	Positif
<i>NDUFB4</i>	NADH déshydrogénase sous-complexe β	Positif
<i>CCR5</i>	Chemokine récepteur 5	Positif
<i>MYH7</i>	Myosine, polypeptide lourd 7 (muscle cardiaque)	Positif
<i>Tpm3</i>	Tropomyosine 3	Positif
<i>CRYAB</i>	Crystalline αB	Négatif
<i>DNAJA1</i>	Hsp40	Négatif
<i>HSPB1</i>	Hsp27	Négatif
<i>PDK4</i>	Pyruvate déshydrogénase kinase, isoforme 4	Négatif

Tableau 3. Quelques gènes dont l'expression est reliée à la tendreté

Adapté de Bernard *et al*, 2007.

protéomique consiste à obtenir des informations sur l'expression protéique des cellules, et en déduire les fonctions des gènes. Cela permet d'expliquer comment l'hérédité et l'environnement interagissent pour contrôler les fonctions cellulaires (Bendixen 2005).

La protéomique est utilisée pour rechercher par exemple des biomarqueurs de situations physiologiques particulières, telles que des maladies. Un marqueur protéique peut être défini comme une protéine dont la présence et / ou l'activité sont responsables d'un phénotype recherché, et qui est facilement visualisable.

V.2 Recherches sur la tendreté des viandes

La protéomique, dans l'étude de la qualité sensorielle des viandes en général et de la tendreté en particulier, est d'un intérêt énorme, non seulement dans la compréhension des systèmes musculaires complexes qui régissent la tendreté et sa variabilité, mais également pour l'analyse de marqueurs de la tendreté. La recherche protéomique permettra de remonter à l'information génétique grâce aux données provenant du séquençage.

V.2.1 Chez le porc

Une comparaison du contenu protéique du muscle porcin *Longissimus dorsi* au moment de l'abattage et 72 heures après a été réalisée par Lametsch *et al* (2003). Les résultats montrent que 103 spots diffèrent de manière significative 72 heures après l'abattage. Parmi ceux-ci, 27 ont été identifiés (Tableau 4). Les 11 fragments de l'actine montrent que cette protéine est dégradée durant la maturation, comme d'autres protéines myofibrillaires telles que les chaînes légères et lourdes de myosine, la titine, CapZ, et la cofiline. Cela affaiblit la structure myofibrillaire et donc augmente la tendreté de la viande. L'expression de protéines sarcoplasmiques telles que l'énolase 1 et 3, phosphoglycérate kinase, pyruvate déshydrogénase, glycogène phosphorylase, triosephosphate isomérase I, myokinase et le facteur de traduction eIF-5A, change aussi. Il n'a pas été possible de déterminer si ce sont des fragments ou les protéines entières qui sont présentes. En revanche, deux fragments de la glycogène phosphorylase sont présents. Dans cette étude de Lametsch *et al* (2003), la variation *post-mortem* de la triose phosphate isomérase I est hautement corrélée à la tendreté. L'étude de Laville *et al* (2007) montre entre autre que l'aldo-réductase et la FABP-A sont des marqueurs de tendreté, contrairement à la malate déshydrogénase et l'ACBP, qui sont des marqueurs de dureté.

Protéine
Actine (11 fragments)
Chaîne lourde de myosine
CapZ
Titine
Chaîne légère de myosine I
Cofiline 2
Chaîne légère de myosine II
Enolase I
Enolase III
Phosphoglycérate kinase
Pyruvate déshydrogénase
Glycogène phosphorylase (1)
Glycogène phosphorylase (2)
Triose phosphate isomérase I
Myokinase
eIF-5A

Tableau 4. Protéines identifiées dont l'expression est significativement différente entre l'abattage et 72 heures après

Adapté de Lametsch *et al* , 2003.

V.2.2 Chez le bovin

La cartographie protéique du muscle de bovin *Semitendinosus* a d'abord été réalisée en gradient de pH acide par Bouley *et al* (2004) puis en gradient de pH basique par Chaze *et al* (2006). Pour cela, des échantillons du muscle ont été soumis à une électrophorèse en deux dimensions (2DE). Par l'analyse protéomique de Bouley *et al* (2004), ce sont 103 produits de gènes différents qui ont été révélés. Les protéines ont été identifiées par MALDITOF puis par comparaison avec les bases de données protéiques humaines, murines et bovines. Les protéines identifiées sont impliquées dans le métabolisme musculaire (25,5 % des protéines), la structure cellulaire (17 %), la défense cellulaire (16 %) et l'appareil contractile (14,5 %). Cette étude a permis de visualiser le protéome du muscle *Semitendinosus* sur une gamme de pH de 4 à 7. Quant à l'étude de Chaze *et al* (2006), elle a permis de compléter ces résultats par la visualisation du protéome basique sur une gamme de pH de 7 à 11 (60 protéines identifiées). Cela a mené par exemple à l'identification de 5 isoformes de troponine T rapide supplémentaires par rapport à celles identifiées par Bouley *et al* (2004). Grâce à la protéomique, il est donc possible d'analyser un grand nombre de protéines musculaires, et ouvre la voie pour l'étude de la contraction musculaire ou les événements intervenant dans la tendreté.

Une analyse protéomique du phénotype culard des bovins a été effectuée (Bouley *et al* 2005). Ce phénotype, dû à une mutation monogénique de la myostatine, confère un nombre de fibres rapides glycolytiques IIX plus important, tout comme les bovins sélectionnés pour leur forte croissance (Picard *et al* 2006). De plus, le collagène est plus soluble. Cela a pour résultat l'obtention d'une quantité de viande plus importante et de meilleure tendreté. Ainsi, ces animaux culards constituent un excellent modèle pour la compréhension des mécanismes à l'origine de la tendreté. La caractérisation du protéome du muscle *Semitendinosus* a été effectuée sur des animaux hétérozygotes (HDM) ou homozygotes (DM) pour la délétion du gène de la myostatine avec des animaux normaux (NDM), afin de mettre en lumière les protéines impliquées dans l'amélioration de la tendreté de la viande chez les animaux HDM et DM. Les résultats de cette étude montrent un changement du protéome dans le muscle des animaux DM par rapport aux NDM (Tableau 5). Des protéines de l'appareil contractile sont concernées. C'est le cas de la myosin-binding protein H (MyBP-H), la chaîne légère de myosine 1 (MLC1), le régulateur de la chaîne légère de myosine 2 (MLC2), la chaîne légère de myosine 3 (MLC3), et les troponines T lentes (sTnT) et rapides (fTnT). La variation de la

<i>Appareil contractile</i>	
Myosin-binding protein H (MyBP-H)	<u>Augmentation</u>
Slow troponin T (sTnT)	Diminution
Fast troponin T (fTnT) (exon 16)	<u>Augmentation</u>
Fast troponin T (fTnT) (exon 17)	Diminution
Myosin light chain 1, A/B isoform (MLC1)	Diminution
Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform (MLC2)	<u>Augmentation</u>
Myosin light chain 3, skeletal muscle isoform (MLC3)	<u>Augmentation</u>
<i>Métabolisme</i>	
Phosphoglucomutase (PGM)	<u>Augmentation</u>
Fatty-acid-binding protein, heart (H-FABP)	Diminution
<i>Autre</i>	
Sarcosin	<u>Augmentation</u>
Sarcoplasmic reticulum 53kDa glycoprotein (SR53G)	<u>Augmentation</u>
p21	Diminution

Tableau 5. Protéines identifiées lors de la comparaison protéomique entre bovins culards et normaux

L'augmentation ou la diminution de l'expression de ces protéines chez les bovins culards par rapport aux bovins normaux est indiquée.

Adapté de Bouley *et al* , 2005.

quantité de certaines protéines est due à une variation de l'expression génique, comme pour MyBP-H ou MLC1 par exemple, à des modifications post-traductionnelles différentes comme pour MLC2, ou par des mécanismes d'épissages alternatifs différents, amenant à la production d'autres isoformes protéiques, comme la troponine T rapide. Des protéines du métabolisme, comme la phosphoglucomutase (PGM) ou la protéine de reconnaissance des acides gras (H-FABP) connaissent également une variation quantitative, tout comme la glycoprotéine du réticulum sarcoplasmique SR53G (rôle dans la contraction / relaxation du muscle) et p20 (associée aux Hsp). Cette étude montre un rôle du facteur de croissance myostatine dans la régulation de l'expression de gènes musculaires en relation avec la masse musculaire et son phénotype. De plus, sa régulation est dose-dépendante puisque les animaux HDM ont un profil d'expression protéique intermédiaire entre les animaux DM et les NDM.

Les bovins sélectionnés depuis des années de façon divergente sur le potentiel de croissance musculaire (Programme Vachotron, sur le poids final des carcasses, l'efficacité alimentaire, la vitesse de croissance, la proportion de gras et d'os) ont été les cibles d'études similaires (Bouley *et al* 2004). Deux populations ont été obtenues : les animaux à fort développement musculaire (P) et d'autres animaux à faible développement musculaire (M). Le protéome du muscle *Semitendinosus* a été analysé et comparé entre ces deux populations afin de mieux comprendre les modifications du phénotype musculaire. Neuf protéines ont été identifiées comme étant différenciellement exprimées de manière statistiquement significative entre les deux lots. Six sont associées à l'appareil contractile : MyBP-H, MLC2, deux isoformes de MLC1, une troponine lente sTnT et une rapide fTnT. Les trois autres protéines sont la sarcosine, la peptide methionine sulfoxide réductase et la parvalbumine.

En comparant ces derniers résultats avec ceux obtenus sur les animaux culards (Tableau 6), il apparaît que les variations d'expression des protéines de l'appareil contractile sont similaires, quoique que d'amplitude différente (Bouley *et al* 2004). Grâce à ces études, il est possible de classer les animaux selon leurs profils de croissance musculaire d'après leurs profils protéomiques, et de contrôler l'influence de facteurs d'élevage sur les caractéristiques musculaires, qui *in fine*, agiront sur la tendreté notamment. Il faut rappeler que les animaux à fort potentiel de croissance musculaire ont une viande plus tendre (Renand *et al* 2006).

Une autre étude a été effectuée par Bouley (2004) sur les protéines du muscle *Semitendinosus* provenant d'animaux de trois races différentes : Charolaise (C), Limousine (L) et Salers (S). Pour chaque race, les animaux ont été classés en fonction de la tendreté de

<u>Protéine</u>	<i>Bovins DM</i>	<i>Bovins P</i>
<i>Appareil contractile</i>		
Myosin-binding protein H (MyBP-H)	Augmente (5,2)	Augmente (5,3)
Slow troponin T (sTnT)	Baisse (5,1)	Baisse (2)
Fast troponin (FTnT) exon 16	Augmente (3,7)	Augmente (2,2)
Fast troponin (FTnT) exon 17	Baisse (1,7)	Baisse (1,3)
Myosin light chain 1 (MLC1) isoform A/B	Baisse (3,3)	Baisse (2,1)
Myosin regulatory light chain 2 (MLC2) skeletal muscle isoform	Augmente (2,0)	Augmente (2,3)
Myosin light chain 3 (MLC3), skeletal muscle isoform	Augmente (2,7)	Augmente (1,6)
<i>Métabolisme</i>		
Phosphoglucomutase (PGM)	Augmente (1,4)	Augmente (1,3)
Fatty acid-binding protein (H-FABP)	Baisse (2,7)	
<i>Autres</i>		
Sarcosin	Augmente (3,1)	Baisse (2,6)
Peptide methionine sulfoxide reductase (MSRA)	Augmente (1,4)	Augmente (2,0)
Parvalbumin (PV)	Augmente (1,9)	Augmente (4,0)
Sarcoplasmic reticulum 53kDa glycoprotein (SR53G)	Augmente (2,9)	
p20	Baisse (2,0)	Baisse (1,3)

Tableau 6. Protéines différenciellement exprimées chez les bovins culards (DM) et sélectionnés sur le potentiel de croissance (P)

La variation de l'expression des protéines entre les animaux DM (culards) d'une part et P (fort potentiel de croissance) d'autre part par rapport aux animaux M (faible potentiel de croissance) est indiquée.

Adapté de Bouley, 2004.

leur viande : élevée (T+) ou faible (T-). Les résultats montrent qu'au sein de la race C, 10 protéines sont différenciellement exprimées entre les deux lots de tendreté différente, 5 protéines au sein de la race L, et 5 protéines au sein de la race S (Tableau 7). Ainsi, chez les Charolais, 6 protéines sont associées à l'appareil contractile : MyBP-H, fTnT, sTnT, MLC1sa, MLC2-P et MLC2. La parvalbumine est impliquée dans le cycle du calcium, la protéine Hsp27 est une chaperonne de petite taille. Une protéine de petite taille n'a pas été identifiée. Pour la race limousine, deux protéines sont associées à l'appareil contractile : MyBP-H et MLC2, PV est associée au cycle du calcium, et ACBP est associée au cycle de l'acétyl-coA. La petite protéine non identifiée est également retrouvée. Pour la race Salers, deux protéines appartiennent au métabolisme glycolytique : la PGM et la LDH-B. Aucune protéine différenciellement exprimée n'est commune aux trois races. Grâce à ces observations, il apparaît que le déterminisme de la tendreté est différent selon la race des animaux. Néanmoins, les races à viande (C et L) semblent se distinguer des races rustiques (S), les viandes de ces dernières étant plus oxydatives et métabolisant moins le glycogène.

La protéine SR53G est associée au cycle du calcium, et la modification de son expression pourrait être liée à la contraction musculaire et à l'activité des protéases calcium-dépendantes. La PV est également associée au cycle du calcium, et elle est corrélée positivement à la tendreté. D'une manière générale, les protéines intervenant dans le cycle du calcium semblent avoir un rôle dans le déterminisme de la tendreté. La protéine ACBP est impliquée dans le métabolisme de l'acyl-coA, et aurait un rôle dans le cycle du calcium, et donc influence sur la tendreté. Une surexpression de la protéine chaperonne Hsp27 augmente la stabilité de l'actine, dont la dégradation lors de la maturation de la viande est importante pour la tendreté.

Une compilation des résultats de Bouley (2004) et Bouley *et al* (2005) permet de mettre en évidence les protéines étant corrélées à la fois à la tendreté et à l'hypertrophie musculaire chez les bovins normaux et culards (Tableau 8). Certaines protéines ont un effet positif ou négatif à la fois sur la tendreté et l'hypertrophie musculaire. Ces protéines présentent donc un intérêt important car une modification de leur expression, par le biais de changements des moyens d'élevage, peut augmenter la masse musculaire de l'animal tout en garantissant une amélioration de la tendreté de sa viande.

Ces différents travaux de protéomique accomplis ont montré l'importance et la fiabilité de cette voie dans l'étude et l'analyse de la tendreté. Cependant, le déterminisme de la tendreté est multifactoriel, d'où une grande différence de tendreté constatée entre les différentes races, muscles et mode d'élevage. Ainsi, d'autres études protéomiques ont été effectuées sur

Charolais

Protéine	Rapport
Phosphoglucomutase (PGM)	-2
Myosin-binding protein H (MyBP-H)	2,1
Fast troponin T (fTnT) exon 17	2
Slow troponin T (sTnT)	2,3
Myosin light chain 1 A isoform (MLC1sa)	2
Myosin regulatory light chain2 skeletal muscle isoform (MLC2-P)	2,5
Myosin regulatory light chain2 skeletal muscle isoform (MLC2)	-2,4
Parvalbumin (PV)	7,8
Heat shock protein 27 (Hsp27)	-2
Non identifiée (pHi5,7 / 8kDa)	2,2

Limousin

Protéine	Rapport
Myosin-binding protein H (MyBP-H)	2
Myosin regulatory light chain2 skeletal muscle isoform (MLC2)	-2,1
Parvalbumin (PV)	3,5
Acyl-coA binding protein (ACBP)	2,2
Non identifiée (pHi5,7 / 8kDa)	2,5

Salers

Protéine	Rapport
Phosphoglucomutase (PGM)	-2,5
Lactate dehydrogenase B chain (LDH-B)	-2,1
Sarcoplasmic reticulum 53kDa glycoprotein (SR53G)	-8
p20	-2,1
Non identifiée (pHi 6,5 / 65kDa)	2,1

**Tableau 7. Protéines identifiées dans l'étude de la tendreté de la viande
chez trois races bovines, dans le lot T+**

Les protéines retrouvées dans plusieurs races sont en gras. Les rapports d'expression protéique du lot T+ sont indiqués par rapport au lot T-.

Adapté de Bouley, 2004.

Protéine	Corrélation Hypertrophie / Tendreté
<i>p20 014558, spot 122</i>	p20 Négaive / Négaive (S)
<i>Slow troponin T (low Mr)</i>	sTnT Négaive / Positive (C)
<i>Fast troponin T exon 17</i>	fTnT Négaive / Positive (C)
<i>Myosin light chain 1, isoform A</i>	MLC1a Négaive / Positive (C)
<i>Sarcoplasmic reticulum 53kDa glycoprotein</i>	SR53G Positive (culard uniquement) / Négaive (S)
<i>Phosphoglucumutase</i>	PGM Positive (culard uniquement) / Négaive (C, S)
<i>Myosin Regulatory lightchain 2, skeletal muscle isoform (phosphorylated, spot 135)</i>	MLC2-P Positive / Positive (C)
<i>Parvalbumin</i>	PV Positive / Positive (C, L)
<i>Myosin-binding protein H</i>	MyBP-H Positive / Positive (C, L)

Tableau 8. Protéines identifiées à la fois comme intervenant dans l'hypertrophie musculaire et impliquées dans des viandes de tendreté supérieure (cas du muscle *Semitendinosus*)

Les protéines de l'hypertrophie musculaire concernent les animaux culards et normaux à forte croissance musculaire. Les protéines de viandes de tendreté supérieures ont été trouvées dans les races Charolaise (C), Limousine (L) et Salers (S) sans être forcément communes aux trois races.

Les protéines les plus intéressantes, c'est-à-dire celles qui sont corrélées dans le même sens à la fois pour le tendreté et l'hypertrophie musculaires, sont en gras.

Réalisé à partir des résultats de Bouley (2004) et Bouley *et al* (2005)

d'autres muscles et sur d'autres environnements (génétiques, élevage) afin de compléter les données obtenues dans le cadre des travaux de Bouley *et al.*

Des analyses protéomiques (gels 2DE, spectrométrie de masse) portant sur le muscle bovin *Longissimus dorsi* effectuées par Sawdy *et al* (2004) 36 heures *post-mortem*, ont permis la visualisation de 7 bandes sur gel 2DE qui sont corrélées positivement avec la tendreté à 7 jours après abattage. Parmi celles-ci, deux ont été identifiées comme étant des fragments de chaîne lourde de myosine bovine. Ces résultats montrent que la dégradation des protéines myofibrillaires, en l'occurrence ici de la chaîne lourde de myosine, est un acteur important de la tendreté. De plus, l'analyse de la dégradation de ces protéines 36 heures après l'abattage serait un bon outil de prédiction de la tendreté à 7 jours, voir de classification des carcasses en fonction de leur catégorie de tendreté.

Une comparaison de profils protéomiques a été effectuée sur deux muscles bovins, le *Longissimus dorsi* (LD, le plus tendre), et le *Semitendinosus* (ST, le plus dur) par Jia *et al* (2006). Les auteurs ont réalisé la comparaison des profils protéiques de ces deux muscles au moment de l'abattage (T = 0) et 24 heures après (T = 24). Il en ressort que 13 spots protéiques sont différenciellement exprimés entre les deux temps dans le muscle LT et 18 pour le ST (Tableau 9).

Au sein des deux muscles, il y a une diminution de cofiline, du substrat de la protéine mitochondriale ATP-dépendante SP-22, des Hsp27 et Hsp20. La cofiline, connue pour contrôler la polymérisation de l'actine, chute de manière plus drastique dans le ST. Plusieurs isoformes de Hsp27 sont observées. L'une d'elle connaît une chute d'expression importante dans le muscle LT. Les Hsp27 et Hsp20 sont des protéines chaperonnes impliquées dans l'organisation et la protection des structures myofibrillaires, et localisées au niveau des structures sarcomériques telles que les bandes Z et I. L'enzyme métabolique lactoylglutathione lyase, intervenant dans la voie de production de l'acide lactique, voit son expression augmenter en particulier dans le ST. Cette enzyme reflète la transition vers le métabolisme anaérobie après l'abattage.

Les différences protéiques observées entre les deux muscles seraient à mettre en relation avec l'évolution de la tendreté distincte entre le LT et ST. L'expression de l'enzyme glycolytique triosephosphate isomérase chute dans le LT. Cette enzyme est corrélée à la tendreté dans la viande porcine (Lametsch *et al* 2003). Dans le ST, des changements sont constatés pour les protéines structurales que sont l'actine alpha 1 et la chaîne alpha de

Longissimus dorsi

Protéine	Rapport d'expression
Myosin light chain 1 fragment	11,2
<i>Cofilin</i>	-7,2
Triosephosphate isomerase	-6,7
<i>Lactoylglutathione lyase</i>	3,4
Inconnu	-9,1
Inconnu	-9,6
Myosin regulatory light chain 2	-3,1
<i>Heat shock 27 kDa protein (isoform pHi = 6,3 - Mr = 25,0)</i>	-3,3
<i>Heat shock 27 kDa protein (isoform pHi = 6,2 - Mr = 25,5)</i>	-4,7
<i>Heat shock 27 kDa protein (isoform pHi = 5,9 - Mr = 25,5)</i>	-13,4
<i>Substrate protein of mitochondrial ATP-dependent proteinase SP-22</i>	-0,7
Beta-actin (fragment)	-12,1
<i>Heat-shock protein beta-2 HSP20 (pHi = 5,2 - Mr = 20,0)</i>	-5,7

Semitendinosus

Protéine	Rapport d'expression
<i>Cofilin</i>	-17,4
T-complex-type molecular chaperone TCP1	-2,8
Proteasome subunit alpha type 3	-2,6
Proteasome subunit beta type 3	-3,5
<i>Lactoylglutathione lyase</i>	40,6
<i>Substrate protein of mitochondrial ATP-dependent proteinase SP-22</i>	-2,2
Proteasome subunit beta type 7	-2,4
Inconnu	-1,6
<i>Heat shock 27 kDa protein (isoform pHi = 6,1 - Mr = 26,0)</i>	-10,3
<i>Heat shock 27 kDa protein (isoform pHi = 6,4 - Mr = 26,0)</i>	-6,2
Proteasome beta-subunit	-2,3
Actin alpha 1 skeletal muscle protein	-3,2
14-3-3 protein	-3,7
Tubulin alpha chain	-4,9
26S protease regulatory subunit 6A (TAT-binding protein 1)	-5,2
Mitogen-activated protein kinase 14	-1,6
Proteasome 26S subunit MSS1	-2,3
<i>Heat-shock protein beta-6 HSP20 (pHi = 6,5 - Mr = 19,0)</i>	-5,9

Tableau 9. Protéines différenciellement exprimées dans les muscles LD et ST entre les temps T=0 et T=24

Les rapports d'expression entre les deux temps pour un muscle correspondent à des pourcentages de volume de spot sur les gels 2DE, après analyse digitale des images. Les protéines communes aux deux muscles sont en gras.

tubuline, dont l'abondance diminue. Dans ce même muscle, la quantité de sous-unités du protéasome baisse également. Le protéasome est ATP-dépendant et la disparition de la molécule énergétique pourrait être la cause de cette dégradation. Le rôle du protéasome dans la maturation *post-mortem* est encore peu clair, mais il pourrait contribuer à la maturation et ainsi être un facteur favorable à la tendreté. D'autres protéines comme la TCP1, la protéine 14-3-3 et la kinase 14 subissent également une diminution de leur expression à cause de la disparition de l'ATP. Leur contribution à la tendreté est inconnue.

Cette étude souligne la disparité qu'il existe au sein d'un même animal entre deux muscles différents (le LT et le ST) au niveau physiologique, métabolique et protéique. Il en découle une tendreté différente, résultante de facteurs distincts et communs entre les muscles, qui met en lumière le rôle de certaines protéines. De nombreuses études de ce type restent à réaliser afin d'apporter plus de connaissance sur les mécanismes à l'origine de la tendreté.

L'étude du protéome du muscle bovin *Longissimus thoracis* par Morzel *et al* (2008) a montré que l'abondance de succinate deshydrogénase est corrélée positivement avec la tendreté ($r = 0,81$). Cette enzyme mitochondriale du cycle de Krebs, associée aux fibres oxydatives, pourrait être un prédicteur de la tendreté. Les données montrent que la quantité de protéines dégradées au cours de la maturation augmente, comme l'actine, la créatine kinase, l' α -crystalline et la Hsp27 qui seraient des substrats de la protéolyse *post-mortem*.

Chez l'animal vivant, l'importante quantité de Hsp27 protège l'actine de la dégradation. Mais après l'abatage, la protéolyse de l'actine augmente. En effet, Hsp27 joue un rôle dans la prévention de l'agrégation protéique et favorise ainsi l'accès des protéases à leurs cibles. La protéolyse durant la maturation est donc facilitée, ce qui a pour conséquence une augmentation de la tendreté. La protéine Hsp27 pourrait constituer un marqueur pertinent de la tendreté, une haute concentration de cette protéine dans l'animal vivant étant liée à une meilleure tendreté après maturation. Le rôle de l' α -crystalline est comparable à celui de la Hsp27, mais pour la desmine.

Le programme MUGENE a permis d'identifier des marqueurs de tendreté et de dureté du muscle LT sur des taurillons Charolais. Les résultats sont en accord avec ceux présentés précédemment (Hocquette *et al* 2007a). Les protéines troponine T rapides, phosphoglucomutase, les isoformes rapides de chaînes lourdes de myosine, la glycogène phosphorylase sont des marqueurs de dureté. Au contraire, l'apoBEC, les isoformes lentes de chaînes lourdes de myosine et l'ATP synthase chaîne β sont des marqueurs de tendreté.

Le programme QUALVIGENE a identifié des marqueurs de tendreté et de dureté du muscle LT dans 3 races françaises : Blonde d'Aquitaine, Charolais et Limousin (Chaze *et al* 2009). Ainsi, pour la race Blonde d'Aquitaine, quelques marqueurs identifiés sont :

- Dureté : troponine T rapide, β -enolase, α -crystalline chaîne B, Hsp20.
- Tendreté : myosin regulatory light chain 2, CapZ- β .

Pour les Charolais :

- Dureté : myosin regulatory light chain 2, phosphoglucomutase, troponine T rapide, CapZ- β .
- Tendreté : DJ-1, glutathione S-transférase P.

Pour les Limousins :

- Dureté : β -enolase, CapZ- β , Stress Induced Phosphor Protein 1, GADPH, DJ-1.
- Tendreté : α -enolase, α -crystalline chaîne B, Hsp20.

Ce programme a montré que les protéines explicatives de la tendreté ne sont pas les mêmes entre différentes races, mais les mécanismes cellulaires impliqués restent les mêmes et sont cohérents avec les résultats d'études antérieures.

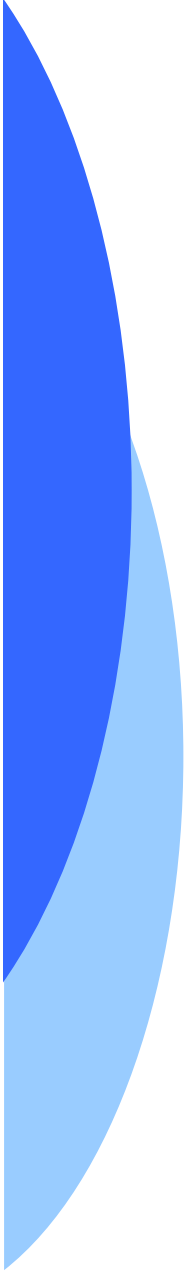
Les analyses protéomiques ont permis l'analyse de nombreux profils de muscles bovins et de relier la tendreté avec l'expression des protéines. Toutefois, les résultats montrent une grande variabilité du contenu protéique des muscles entre races, animaux et muscles (voir les résultats présentés précédemment de Bouley *et al*, Sawdy *et al*, Jia *et al*, Morzel *et al*). Certaines protéines sont liées à la tendreté dans plusieurs études (comme la triose phosphate isomérase ou la chaîne légère de myosine par exemple). D'autres, telles que la Hsp27, sont corrélées négativement à la tendreté selon Bouley *et al* (2004) et Herrera-Mendez *et al* (2006), mais leur présence dans l'animal avant abattage est d'une grande importance pour la tendreté d'après Morzel *et al* (2008). Les mécanismes contrôlant la tendreté sont donc loin d'être explicités et une vue d'ensemble reste encore à dégager par des études approfondies des différents muscles bovins, notamment en ce qui concerne les protéines du choc thermique.

VI Bilan de l'état des connaissances

Les différents travaux menés sur la tendreté de la viande bovine ont permis d'identifier des marqueurs protéomiques et génétiques. Certains d'entre eux servent de base pour l'utilisation

de tests commerciaux. D'autres travaux ont également démontré des variations de l'impact de ces marqueurs sur la tendreté, selon les systèmes de production considérés.

Ainsi, l'ensemble de ces connaissances sert de support à l'étude entreprise durant la thèse, et permet d'établir des listes de protéines considérées comme des marqueurs potentiels pertinents à analyser pour la filière française. La relation entre l'abondance de ces protéines et la tendreté sera analysée afin d'établir des équations de prédiction de tendreté et de mieux comprendre les mécanismes de mise en place de cette qualité de la viande.



Matériels et Méthodes

MATERIELS ET METHODES

I Animaux

Les animaux utilisés dans cette étude proviennent du programme ANR GENANIMAL-APISGENE MUGENE, et plus précisément les cohortes des années 2003 et 2005. Les deux années sont constituées par des taurillons et des bœufs de race Charolaise, 28 (17 mois $\pm$ 2 ; 683 kg $\pm$ 82,7) et 23 (30 mois $\pm$ 0 ; 756 kg $\pm$ 60,2) respectivement pour l'année 2003, 39 (17 mois $\pm$ 2 ; 679 kg $\pm$ 59,5) et 21 (30 mois $\pm$ 0 ; 759 kg $\pm$ 86,0) pour l'année 2005. Les taurillons ont été élevés en système intensif à l'auge au domaine expérimental INRA de Bourges, les bœufs au pâturage au domaine expérimental INRA du Pin aux Harras. Ils ont été abattus à l'abattoir expérimental de l'INRA de Theix. Des échantillons des muscles *Longissimus thoracis* (LT, N = 111) et *Semitendinosus* (ST, N = 111) sont prélevés dans les 10 minutes suivant l'abattage, congelés dans l'azote liquide puis stockés à -80°C jusqu'aux analyses. Parallèlement des steaks de chacun des muscles LT et ST sont conservés pendant 21 jours pour l'analyse mécanique, et à 4°C pendant 14 jours pour les échantillons du muscle LT destinés à l'analyse sensorielle. Les steaks sont ensuite congelés et conservés à -20°C jusqu'aux mesures.

II Caractérisation des muscles et de la viande

Les caractérisations des muscles prélevés et de la viande une fois maturée sont effectuées au laboratoire dans le cadre du programme MUGENE. Ces données sont utilisées pour cette thèse.

II.1 Données phénotypiques

Les données phénotypiques concernent :

- les caractéristiques de carcasse des 111 animaux (Renand *et al* 1995)
 - masse de tissu adipeux dans la carcasse en kg
 - pourcentage de muscle dans la carcasse en %
- les caractéristiques des muscles LT et ST, soit 222 échantillons

- des dosages enzymatiques représentatifs du métabolisme oxydatif en $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (citrate synthase, cytochrome C oxidase, isocitrate dehydrogenase) ou du métabolisme glycolytique (lactate dehydrogenase) (Piot *et al* 1998, Jurie *et al* 2007)
- teneur en lipides totaux, phospholipides et triglycérides en $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (Schreurs *et al* 2008)
- teneur en collagène total et insoluble en μg de OH-proline. mg^{-1} (Listrat et Hocquette 2004)
- solubilité du collagène en % (Listrat et Hocquette 2004)
- surface moyenne de section des fibres musculaires en μm^2 par histochimie et analyse d'image (Schreurs *et al* 2008)

II.2 Analyse mécanique – Test Warner-Bratzler

Des cubes d'environ 1 cm de côté sont découpés dans les steaks après 21 jours de maturation, et soumis à un test de Warner-Bratzler, sur viande cuite à 55°C à cœur, dans une cellule d'analyse adaptée. Cette analyse mécanique attribue une mesure de dureté (mesure WB), exprimée en N / cm^2 , à chaque échantillon des muscles LT et ST. Une analyse montre que les moyennes des mesures WB sont différentes entre les muscles LT et ST (38,7 contre 59,9 / $P < 0,001$), entre les deux années 2003 et 2005 (43,8 contre 53,7 / $P < 0,001$), et entre bœufs et taurillons (52,3 contre 46,3 / $P < 0,001$). De plus, bien que les mesures minimales soient équivalentes, les mesures maximales diffèrent entre muscles sur les deux années, en particulier pour le muscle LT (Tableau 10). La répartition des mesures WB, illustrée par des Box-Blot (Figure 33), montre que ces mesures maximales n'appartiennent pas à une distribution Gaussienne normale.

II.3 Analyse sensorielle – Estimation de la note de tendreté de la viande

Les steaks provenant du muscle LT seulement sont soumis à un jury de dégustation entraîné. Celui-ci attribue, sur viande grillée à une température à cœur de 55°C, une note de tendreté globale par analyse sensorielle monadique (note TG). L'analyse monadique attribue une note de tendreté à chaque échantillon du muscle LT indépendamment les uns des autres, selon des critères définies au préalable par le protocole d'expérimentation. Ce type d'analyse permet de juger rapidement un nombre important d'échantillons. Les notes sont situées sur

	<i>Année</i>	<i>Effectif</i>	Warner-Bratzler				Tendreté sensorielle			
			<i>Moyenne</i>	<i>CV%</i>	<i>Max</i>	<i>Min</i>	<i>Moyenne</i>	<i>CV%</i>	<i>Max</i>	<i>Min</i>
LT	2003	51	34,68	17,73	49,30	21,82	5,19	19,36	7,10	3,10
	2005	60	43,65	26,75	83,26	25,55	4,48	14,10	6,04	3,04
ST	2003	51	52,84	25,68	96,50	30,90	<i>Non disponible</i>			
	2005	60	63,80	25,29	114,73	35,92				

Tableau 10. Description des mesures Warner-Bratzler et des notes de Tendreté sensorielle

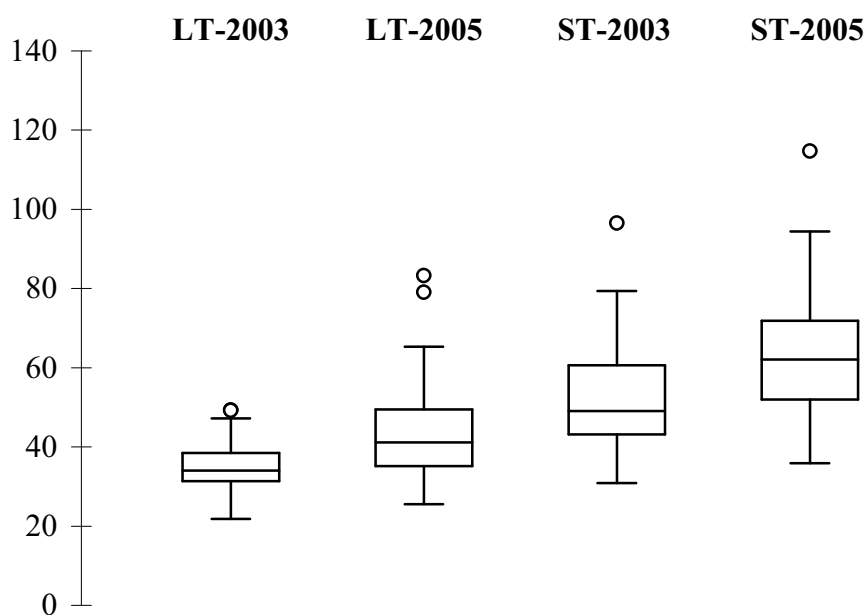


Figure 33. Représentation en Box-Plot des mesures de Warner-Bratzler

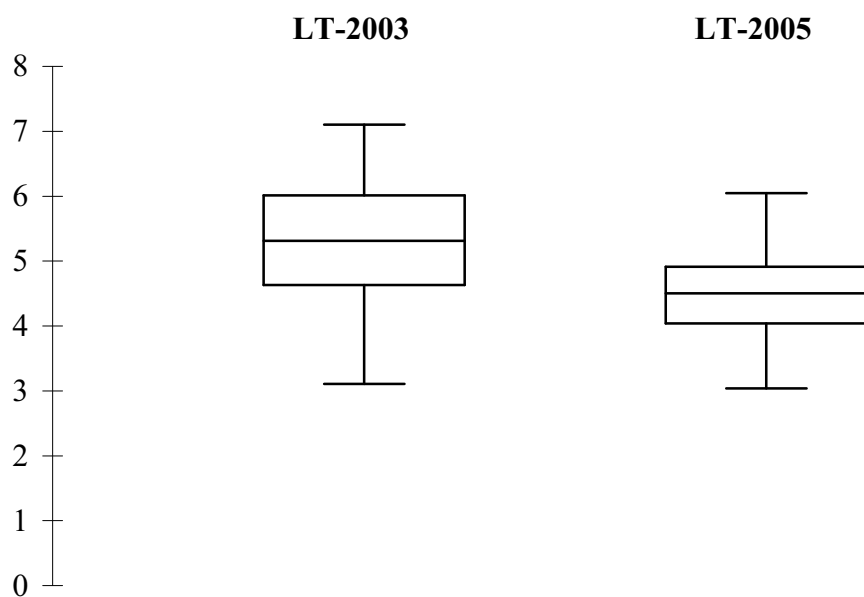


Figure 34. Représentation en Box-Plot des notes de Tendreté Sensorielle

une échelle de 1 à 10, la note minimale étant 1. Une analyse (Tableau 10) montre que les moyennes des notes TG du muscle LT sont différentes entre les deux années (5,21 pour 2003 contre 4,49 pour 2005 / $P < 0,001$). Une représentation en Box-Plot montre que la répartition des notes de l'année 2003 est plus étendue que l'année 2005 (Figure 34). Aucune note n'est exclue de la répartition normale.

La mesures WB (dureté de la viande) et la notes TG (tendreté de la viande) sont opposées pour le muscle LT, avec un coefficient de corrélation de $-0,25$ ($P < 0,01$).

III Quantification des protéines

III.1 Démarche expérimentale

Les études menées au cours des années antérieures permettent de fournir un important panel de marqueurs potentiels de la tendreté sous forme de protéines, ARN ou ADN, dans différentes races, types d'animal, muscles, et système de production (pour revue : Picard *et al* 2010). La démarche adoptée pour la thèse consiste tout d'abord à sélectionner les protéines les plus pertinentes à étudier pour caractériser la tendreté. Afin de réaliser la quantification des protéines, il est essentiel de disposer d'anticorps spécifiques de chaque protéine. Cependant, la grande majorité des anticorps disponibles dans le commerce sont garantis spécifiques chez l'humain ou la souris, rarement chez le bovin. C'est pourquoi la première étape du travail consiste à s'assurer de la spécificité des anticorps disponibles sur les échantillons de muscle bovin, en utilisant la technique de Western-Blot. La liste des protéines à étudier est par la suite épurée des protéines pour lesquelles il n'existe pas d'anticorps satisfaisant pour une quantification chez le bovin. Ces quantifications sont effectuées par Dot-Blot en fluorescence, technique mise au point dans ce travail de thèse, sur l'ensemble des échantillons du programme MUGENE (222) et pour chaque protéine retenue pour l'étude. Les résultats permettront par la suite d'étudier la relation entre les protéines et la tendreté.

III.2 Extraction des protéines et dosage

Les échantillons sont décongelés, puis 100 mg de chacun sont pesés pour extraire les protéines. Il s'agit d'une extraction totale avec des détergents non ioniques selon le protocole de Bouley *et al* (2004), qui permet d'obtenir le maximum de protéines. Les 100 mg de chaque échantillon sont broyés dans un tampon d'extraction (urée 8.3 M, thiourée 2 M, chaps 2%, DTT 1%). Les protéines, solubilisées dans le tampon d'extraction, sont dénaturées par l'urée

(destruction de la structure spatiale des protéines) et le dithiothréitol (réduction des ponts disulfures). Une centrifugation permet de séparer la fraction protéique soluble de la fraction solide contenant les acides nucléiques et le collagène.

Chaque échantillon protéique est ensuite dosé par la méthode de Bradford. Il s'agit d'une méthode de dosage colorimétrique, reposant sur le principe de l'absorbance du Bleu de Coomassie à 595 nm. En effet, le Bleu de Coomassie se complexe avec les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et les résidus hydrophobes des acides aminés. L'absorbance à 595 nm d'une solution contenant du Bleu de Coomassie augmente proportionnellement avec la concentration en protéines qu'elle contient. Ainsi, 5 µL d'échantillon, dilués dans 95 µL d'eau, sont mélangés avec 3 mL de solution de Bradford. L'absorbance de la solution est mesurée par un spectrophotomètre (Bradford 1976), puis rapportée à une gamme étalon constituée de concentrations différentes connues de BSA, servant de référence. Cela permet de déterminer pour chaque échantillon une quantité de protéines en µg / µL. La concentration en protéines des 222 échantillons de LT et ST est ainsi déterminée. Chaque extraction protéique est aliquotée dans plusieurs cupules, afin d'éviter de trop nombreux cycles de congélation / décongélation au cours de la thèse, néfastes à l'intégrité de la solution d'urée / thiourée.

III.3 Validation de la spécificité des anticorps par Western-Blot

Les anticorps disponibles dans le commerce sont tous certifiés comme étant spécifiques dans leur espèce-cible. Il faut donc s'assurer de la spécificité de ces anticorps dans le muscle bovin par une méthode simple. Pour cela, un Western-Blot de l'anticorps testé contre des échantillons de muscle bovin permet de vérifier si la taille de la protéine reconnue est conforme à la taille théorique attendue chez le bovin. Cette technique permet également de vérifier la spécificité de l'anticorps, c'est-à-dire si l'anticorps ne reconnaît pas d'autres cibles. Deux techniques de révélation sont disponibles : la chemiluminescence, qui a été remplacée par la fluorescence après la mise au point de cette dernière au cours de la thèse.

Les échantillons sont dénaturés par ajout d'un volume égal de solution de lyse (glycérol 20 %, Tris 12,5 mM pH6,8, SDS 4 %, Pyronin Y 10 mg, β-mercaptoéthanol 1,42 M). Les échantillons reposent 10 minutes à température ambiante avant d'être incubés à 60°C pendant 10 minutes. Ensuite, les échantillons sont déposés dans un gel SDS-PAGE. Le premier gel de concentration à 4 % (acrylamide 4 %, bisacrylamide 0,08 %, Tris 125 mM pH6,8, SDS 0,1 %,

TEMED 0,08 %, PAS 0,04 %) sert de support aux puits de dépôt, et à concentrer les protéines au début de la migration. Le second gel de séparation SDS-PAGE à 12 % (acrylamide 12 %, bisacrylamide 0,23 %, Tris 375 mM pH8,8, SDS 0,1 %, TEMED 0,08 %, PAS 0,04 %) sert à séparer les protéines selon un gradient de taille, par un maillage moléculaire.

Après polymérisation des gels, 15 µg de chaque échantillon sont déposés dans un puit formé dans le gel de concentration. Puis le gel SDS-PAGE est placé dans une cuve Biorad remplie de tampon d'électrophorèse TG-SDS 1X fourni par Amresco (USA). La cuve est ensuite reliée à un générateur, générant un courant électrique (1000 mA, 300 W) faisant migrer les protéines, d'abord à 80 V pendant 20 minutes afin de concentrer les protéines dans le premier gel, puis 120 V pendant 1 heure et 30 minutes afin de séparer les protéines dans le second gel. Toute cette opération est réalisée à 4°C.

Une fois la séparation électrophorétique achevée, les gels sont placés sur une membrane en PVDF de même dimension qu'eux, cette dernière ayant été lavée au préalable à l'alcool. Puis l'ensemble est monté entre des feuilles de papier Wathmann, et placé dans une cuve de Transfert Biorad, remplie de tampon de transfert TG 1X d'Amersham. La cuve est reliée à un générateur, fournissant un courant électrique (600 V, 210 mA, 300 W) afin de transférer les protéines du gel vers la membrane pendant 1 heure. Cette opération est réalisée à 4°C.

Une fois le transfert réalisé, les membranes sont lavées avec une solution de T-TBS 1X (Tris-HCl 11,3 mM, Tris Base 8,75 mM, NaCl 0,137 mM, Tween20 0,05 %) à température ambiante. Puis, elles sont saturées avec une solution de T-TBS 1X contenant 10 % de lait écrémé, à 37°C pendant 20 minutes, lavées, et congelées à -20°C. Cette étape de congélation est nécessaire afin de conserver les membranes en attendant de réaliser l'étape de révélation par anticorps.

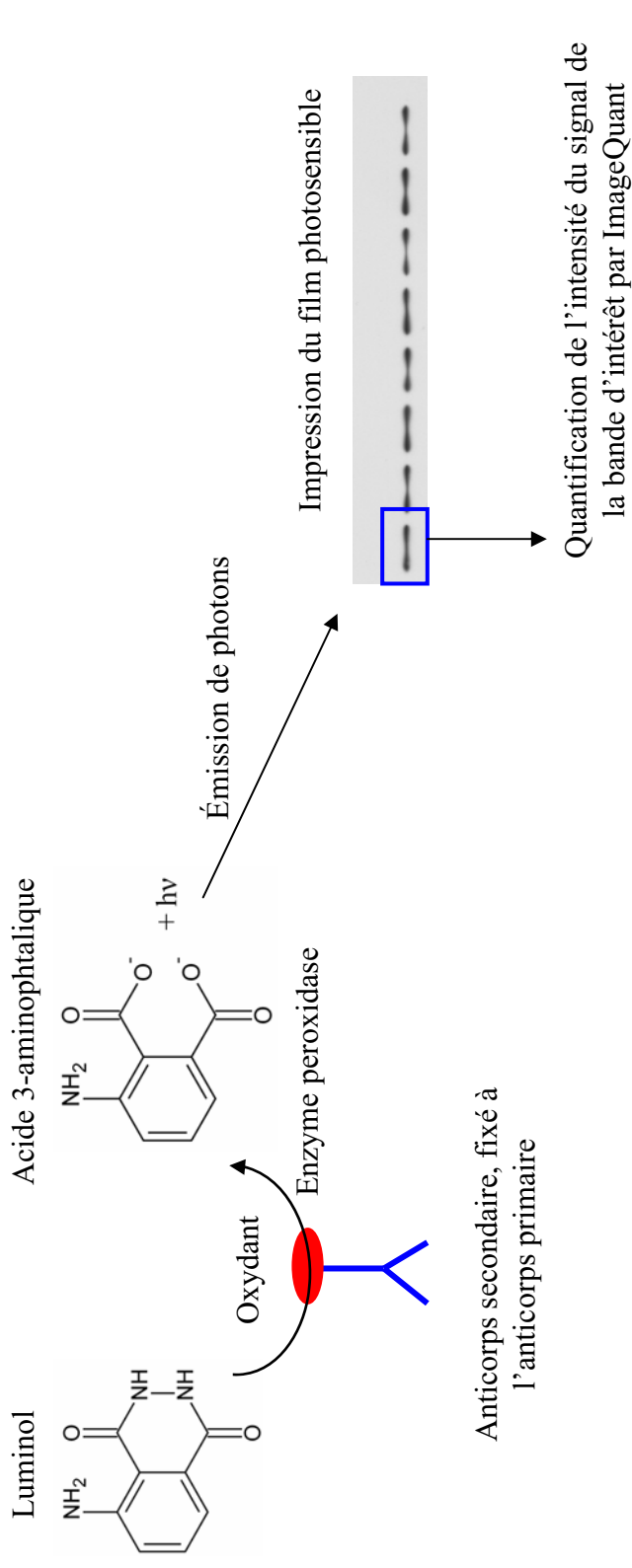
Les membranes décongelées sont lavées avec le tampon T-TBS 1X. Une solution d'hybridation sans ce tampon T-TBS est préparée avec la concentration optimale d'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt. Pour certains anticorps, cette concentration a été déterminée au laboratoire lors d'expérimentations précédant ma thèse. La majeure partie des anticorps utilisés a nécessité une optimisation des conditions d'utilisation. Ces optimisations ont été effectuées dès le début de ma thèse et sont présentées dans la partie Résultats et Discussion. Les membranes sont hybridées avec cette solution, à 37°C pendant 1 heure et 30 minutes, avant d'être révélées, soit par chémiluminescence, soit par fluorescence.

Pour la révélation par chimioluminescence, après hydridation, les membranes sont lavées au T-TBS 1X, puis incubées dans une solution d'anticorps secondaire (anti-souris, anti-lapin, anti-chèvre, selon l'anticorps primaire) pendant 1 heure à température ambiante. Cet anticorps secondaire, couplé à une enzyme peroxidase à son extrémité, est dilué au 1 / 20 000^{ème}. Les membranes sont ensuite lavées avec le T-TBS 1X, séchées, et mises en présence pendant 1 minute d'un mélange réactionnel, composé de luminol et de ferricyanate de potassium, provenant d'un kit ECL fourni par Pierce (ECL Western-Blotting, Référence 32209). Le luminol est alors catalysé par la peroxidase de l'anticorps secondaire, si ce dernier est fixé sur la membrane par réaction avec l'anticorps primaire, pour former un composé émettant des photons, capable d'impressionner un film photosensible (Figure 35A). Les membranes, isolées sous un papier Saran puis dans une cassette Kodak protégeant de la lumière, sont placées sous un film photosensible provenant de chez Kodak. La durée d'impression du film par les photons est de 10 minutes, mais pouvait être adaptée en fonction de la qualité du signal obtenu. Le film est alors révélé par une solution fournie par Kodak, puis fixé par une autre solution également fournie par Kodak. Ce film est scanné pour être ensuite quantifié.

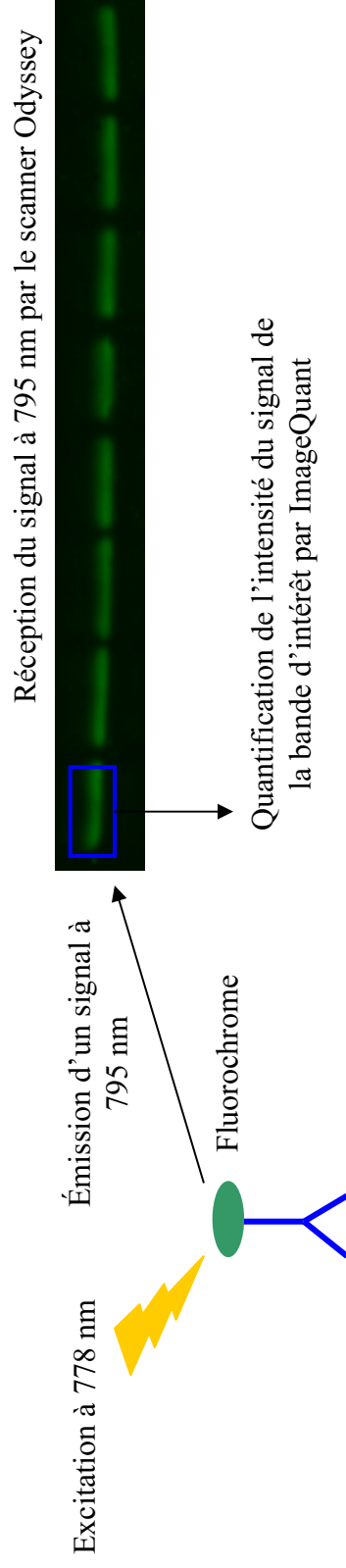
Cette quantification est réalisée avec le logiciel ImageQuant. Les bandes correspondantes à la protéine d'intérêt sont alors repérées et leur signal quantifié. L'intensité du bruit de fond est soustraite à l'intensité du signal. La valeur de l'intensité propre de chacune des bandes est alors obtenue.

Pour la révélation par fluorescence, après hybridation, les membranes sont lavées au T-PBS 1X (NaCl 690 mM, KCl 10 mM, Na₂HPO₄ 45 mM, KH₂PO₄ 5 mM, Tween20 0,1 %), puis incubées dans une solution d'anticorps secondaire fournis par LI-COR Biosciences (anti-souris, anti-lapin, anti-chèvre, selon l'anticorps primaire) pendant 30 minutes à 37°C. Cet anticorps secondaire, couplé à un fluorochrome à son extrémité, est dilué au 1 / 20 000^{ème}. Les membranes sont ensuite lavées avec le T-PBS 1X, puis au PBS (T-PBS 1X sans le Tween20), le tout à l'obscurité. Elles sont ensuite scannées par le scanner à fluorescence Odyssey LICOR à 800 nm. En effet, le fluorochrome fixé à l'anticorps secondaire, lorsqu'il est excité par un laser d'une longueur d'onde de 778 nm, émet un signal fluorescent à une fréquence de 795 nm. Cette excitation est produite par le scanner, qui reçoit ensuite le signal émis par le fluorochrome en réponse (Figure 35B).

La quantification est réalisée avec le logiciel ImageQuant. Les bandes correspondantes à la protéine d'intérêt sont alors repérées et leur signal quantifié. L'intensité du bruit de fond est



A. Révélation par chémiluminescence



B. Révélation par fluorescence

Figure 35. Principe des révélations d'anticorps par chémiluminescence et fluorescence

soustraite à l'intensité du signal. La valeur de l'intensité propre de chacune des bandes est alors obtenue.

III.4 Protéines testées

Les différents travaux antérieurs permettent d'établir une première liste de protéines à étudier (Tableau 11). Parmi ces protéines, seules quelques unes n'ont pas été identifiées comme marqueurs potentiels de la tendreté, mais leur rôle et leurs interactions avec d'autres protéines considérées comme marqueurs potentiels font de ces protéines des cibles pertinentes à étudier. Il s'agit de Hsp60 et Hsp70/GRP75 (interaction avec d'autres HSPsp), Hsp70-8 (partenaire fonctionnel de Hsp40), malate deshydrogenase 2 (en complémentarité de la malate dehydrogenase 1), et super-oxyde dismutase 3 (en complémentarité de la super-oxyde dismutase 1).

III.5 Quantification par Dot-Blot

Cette technique a été développée au cours de la thèse afin de quantifier rapidement un grand nombre d'échantillons. Ainsi, 15 µg de protéines totales par échantillon sont déposés sur une membrane en nitrocellulose, à l'aide d'un appareil Minifold I Dot-Blot Schleicher&Schuell de 96 puits. Les dépôts sont disposés aléatoirement, avec 2 réplicats par échantillons. Deux membranes de 96 puits chacune sont constituées exactement à l'identique, portant le nombre de réplicat par échantillons à 4 (2 réplicats par membrane). Un standard de « mix » de plusieurs échantillons est également déposé, composé de 4 concentrations différentes, et connues, de protéines : 0, 7,5, 15 et 22,5 µg de protéines totales. Les membranes sont séchées à l'air pendant 5 minutes, puis saturées avec une solution de T-TBS 1X contenant 10 % de lait écrémé, à 37°C pendant 20 minutes, puis lavées.

Ensuite l'hybridation avec le premier anticorps se déroule exactement de la même manière que le Western-Blot, afin de respecter les conditions de spécificité des anticorps. Toutes les révélations se font en utilisant la fluorescence.

La gamme du « mix » convertit l'intensité de fluorescence des 4 points (0, 7,5, 15 et 22,5 µg de protéines totales) en quantité arbitraire de protéines ciblées par l'anticorps primaire (respectivement 0, 7,5, 15 et 22,5 unités arbitraires pour les 4 points). Cela permet de développer une équation déterminant la concentration arbitraire des protéines ciblées par l'anticorps primaire d'un spot en fonction de son intensité de fluorescence. Cette équation sert à normaliser les données provenant des différentes membranes, ces données étant rapportées à

Nom protéine	Nom gène	Fonction	Travail ayant révélé la protéine/gène
Actine-β	ACTB	Structure cellulaire	Etude de Jia2006 / Thèse de C. Bernard
Acyl-CoA desaturase	SCD	Métabolisme lipidique	MUGENE
Acyl-coenzyme A thioesterase 2	ACOT2	Métabolisme lipidique	MUGENE
ATP synthase Chaîne B	ATP5B	Métabolisme énergétique	MUGENE
Calpastatine	CAST	Protéolyse	Utilisée dans les tests américains
CapZβ	CAPZB	Structure cellulaire	Etude de Lametsch 2003 / MUGENE
Caspase 3	CASP3	Apoptose	Travail de Ouali 2006 / MUGENE
Caspase 8	CASP8	Apoptose	Travail de Ouali 2006 / MUGENE
Cis-Peroxioredoxine	PRDX6	Stress oxydant	MUGENE
Crystalline α Chaîne B	CRYAB	Stress cellulaires	Thèse de C. Bernard
Desmine	DES	Structure cellulaire	MUGENE
Diacylglycerol O-acyltransferase	DGAT2	Métabolisme lipidique	MUGENE
DJ-1	PARK7	Stress oxydant / Régulation androgène	MUGENE
Enolase 1	ENO1	Métabolisme énergétique	MUGENE
Enolase 3	ENO3	Métabolisme énergétique	Etude de Lametsch 2003
Hsp20	HSPB6	Stress cellulaires	MUGENE / Thèse de J. Bouley / Etude de Jia 2006
Hsp27	HSPB1	Stress cellulaires	MUGENE / Thèse de C. Bernard et J. Bouley / Etude de Jia 2006
Hsp40	DNAAJ1	Stress oxydant	Thèse de C. Bernard
Hsp60	HSPD1	Stress cellulaires	Intéragit avec de nombreuses HSPs
Hsp70-1A/B	HSPA1B	Stress cellulaires	MUGENE
Hsp70-8	HSPA8	Stress cellulaires	Partenaire fonctionnel de Hsp40
Hsp70-Grp75	HSPA9	Stress cellulaires	Intéragit avec de nombreuses HSPs
Lactate Deshydrogenase Chaîne B	LDHB	Stress cellulaires	Thèse de J. Bouley
Malate Deshydrogenase 1 (cytoplasmique)	MDH1	Métabolisme énergétique	MUGENE
Malate Deshydrogenase 2 (mitochondriale)	MDH2	Métabolisme énergétique	Interaction avec MDH1
M-calpaïne	CAPN2	Protéolyse	Utilisée dans les tests américains
Mu-calpaïne	CAPN1	Protéolyse	Utilisée dans les tests américains
Myosin Binding Protein H	MYPBH	Structure cellulaire / Contraction	MUGENE / Thèse de J. Bouley
Myosin Heavy Chain I (slow)	MYH1	Structure cellulaire / Contraction	MUGENE / Thèse de C. Bernard
Myosin Heavy Chain II (fast)	MYH2	Structure cellulaire / Contraction	MUGENE
Myosin Light Chain 1F	MYL1	Structure cellulaire / Contraction	MUGENE / Thèse de J. Bouley
Myosin Regulatory Light Chain 2	MLC2	Structure cellulaire / Contraction	Thèse de J. Bouley
NADH	NADH	Métabolisme énergétique	MUGENE
Phosphoglucumutase	PGM1	Métabolisme énergétique	MUGENE / Thèse de J. Bouley
S100-A1	S100-A1	Contraction / Signalisation	MUGENE
Super-oxyde Dismutase Cu/Zn	SOD1	Stress oxydant	MUGENE
Super-oxyde Dismutase Mitochondriale	SOD3	Stress oxydant	Complémentarité avec SOD1
Triose Phosphate Isomerase	TPI	Métabolisme énergétique	Etude de Lametsch 2003 et Jia 2006
Tropomyosine 3	TPM3	Structure cellulaire / Contraction	Thèse de C. Bernard
Troponine T1	TNNT1	Structure cellulaire / Contraction	Thèse de J. Bouley
Troponine T3	TNNT3	Structure cellulaire / Contraction	Thèse de J. Bouley

Tableau 11. Première sélection de protéines à étudier d'après la bibliographie

La liste des fonctions cellulaires des protéines n'est pas exhaustive

un référentiel commun, la gamme du « mix ». La quantité de protéine d'un échantillon est la moyenne des quantités de chacun de ses réplicats, excepté ceux considérés comme aberrants lors de la quantification.

IV Analyses statistiques

L'ensemble des données : quantification de protéines par Dot-Blot, mesure WB, note TG et mesures phénotypiques, est corrigé pour l'effet année (cohortes 2003 et 2005). Ainsi, pour chaque variable, la formule suivante est utilisée pour calculer la valeur corrigée pour l'effet année de cette variable pour un échantillon ($X_{\text{corrigée}(i)}$).

$$X_{\text{corrigée}(i)} = \text{Moy}_{(i+j)} + (X_i - \text{Moy}_{(i)})$$

Dans cette formule, i est la cohorte de l'échantillon (2003 ou 2005), j étant l'autre cohorte (2005 ou 2003), Moy est la moyenne des valeurs brutes de la variable considérée, et X la valeur brute de la variable considérée pour un échantillon.

Plusieurs contextes d'analyse (ou ensemble d'échantillons) sont définis selon les caractéristiques d'origine en terme de type d'animal et de muscle des échantillons :

- LT de bœufs ($N = 44$)
- LT de taurillons ($N = 67$)
- LT de bœufs et de taurillons ($N = 111$)
- ST de bœufs ($N = 44$)
- ST de taurillons ($N = 67$)
- ST de bœufs et de taurillons ($N = 111$)
- ST et LT de bœufs et de taurillons ($N = 222$)
- Bœufs : muscles LT + ST ($N = 88$)
- Taurillons : muscles LT + ST ($N = 134$)

Suivant les différentes approches, différents contextes ont été considérés.

IV.1 Effets muscle et type d'animal

Dans cette analyse a été considéré le contexte ST et LT de bœufs et de taurillons ($N = 222$).

Une analyse de variance est réalisée en utilisant la procédure GLM de SAS 9.1. Les effets type d'animal, muscle et interaction type d'animal X muscle sont introduits dans le modèle. De plus, un effet animal est introduit afin de tenir compte du fait que les deux muscles

proviennent du même animal. Lorsque des effets significatifs sont détectés, les différences sont évaluées par l'option PDIFF de SAS.

IV.2 Analyse de corrélations

Cette approche a considéré les contextes suivants :

- LT de bœufs (N = 44)
- LT de taurillons (N = 67)
- LT de bœufs et de taurillons (N = 111)
- ST de bœufs (N = 44)
- ST de taurillons (N = 67)
- ST de bœufs et de taurillons (N = 111)
- ST et LT de bœufs et de taurillons (N = 222)

Les corrélations entre protéines, note TG et mesure WB sont calculées avec le logiciel R (version 2.9.0), par un script écrit spécifiquement pour cette tâche. Ce script calcule les coefficients de Pearson et la P-value associée.

IV.3 Analyse descriptive

Cette approche a considéré les contextes suivants :

- LT de bœufs et de taurillons (N = 111)
- ST de bœufs et de taurillons (N = 111)

Une analyse en clusters est réalisée en utilisant la procédure “partitionnement univarié” de XLSTAT (7.5.2) afin de générer trois classes de qualité. En fait 3 analyses sont effectuées :

- (1) à partir de la mesure WB du muscle LT
- (2) à partir de la mesure WB du muscle ST
- (3) à partir de la note TG du muscle LT

Ainsi chaque échantillon se trouve affecté dans l'une des trois classes : Tendreté inférieure, Tendreté moyenne, Tendreté supérieure, ceci pour chacune des analyses décrites ci-dessus. La classe Tendreté inférieure est constituée d'échantillons présentant une mesure WB élevée (analyses 1 et 2) ou d'échantillons présentant une note TG faible (analyse 3). Inversement la classe Tendreté supérieure est constituée d'échantillons présentant une mesure WB faible (analyses 1 et 2) ou d'échantillons présentant une note TG élevée (analyse 3). La classe Tendreté moyenne est constituée des échantillons intermédiaires aux 2 autres classes. Les valeurs de toutes les protéines (quantifications par Dot-Blot) et les données phénotypiques

font l'objet d'une analyse de variance avec un effet « Classe de Qualité » introduit dans le modèle afin d'expliquer leur rôle dans la répartition en classe. Lorsque l'effet classe est significatif, la différence entre classe est déterminée par l'option « Comparaisons » de XLSTAT.

IV.4 Analyse prédictive globale

Cette approche a considéré les contextes suivants :

- LT de bœufs et de taurillons (N = 111)
- ST de bœufs et de taurillons (N = 111)

Afin de calculer une équation prédictive de la tendreté, une première analyse par régression linéaire est effectuée par le module XLSTAT. Les mesures WB (muscles LT et ST) et les notes TG (muscle LT) constituent les variables dépendantes à expliquer, et les abondances des 24 protéines, les variables quantitatives explicatives. Cette analyse permet de définir un coefficient dans l'équation de prédiction pour chacune des 24 protéines. Afin d'apprécier la prédictibilité de l'équation pour chaque échantillon, la valeur absolue de la différence entre la mesure WB ou note TG prédite (V_p) par l'équation et celle mesurée (V_m) est calculée, rapportée à la valeur mesurée, et exprimée en pourcentage ($|V_p - V_m| / V_m \times 100$). Ceci est l'erreur de la prédiction. La première analyse permet de distinguer les échantillons dits « prédictibles », c'est-à-dire présentant une erreur de prédiction inférieure à 15 %, limite considérée arbitrairement comme acceptable pour une équation de prédiction. Les échantillons présentant une erreur de prédiction supérieure à 15 % sont dits « imprédictibles » et ne sont pas retenus pour la seconde analyse par régression. Ainsi, une seconde analyse avec les échantillons dits « prédictibles » est effectuée par le module XLSTAT, les mesures WB (muscles LT et ST) et les notes TG (muscle LT) constituant les variables dépendantes à expliquer, et les abondances des 24 protéines, les variables quantitatives explicatives. La seconde analyse permet de définir des coefficients dans l'équation de prédiction pour chacune des 24 protéines.

IV.5 Analyse prédictive « ciblée »

Cette approche a considéré les contextes suivants :

- LT de bœufs et de taurillons (N = 111)
- ST de bœufs et de taurillons (N = 111)

Une régression linéaire multiple pas-à-pas est réalisée à l'aide de la procédure STEPWISE de SAS (version 9.1), option « Forward ». Les mesures WB (muscles LT et ST) et les notes TG (muscle LT) constituent les variables dépendantes à expliquer, et les abondances des 24 protéines, les variables quantitatives explicatives. Seules les protéines les plus explicatives et significatives du modèle sont retenues. Cette approche permet de définir un coefficient pour chaque protéine retenue dans l'équation de prédiction.

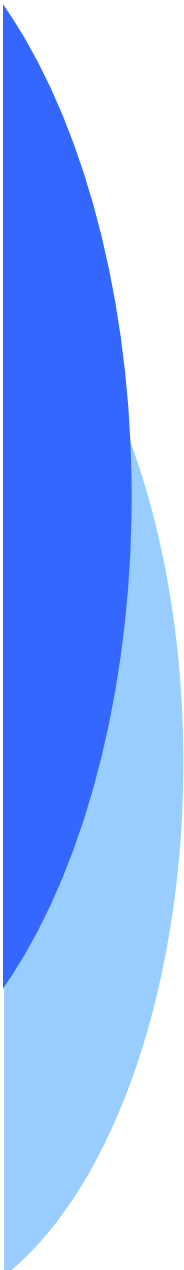
V Interactome

Les informations sur les interactions proviennent de la base de données MiMI (Michigan molecular interactions) (Tarcea *et al* 2009). Seules les interactions démontrées expérimentalement sont considérées pour être incluses dans l'interactome. Afin de construire ce dernier, les protéines humaines correspondant aux protéines bovines sont utilisées, afin de profiter d'une base de données conséquente. Pour cela les noms des gènes bovins sont convertis en noms de gènes humains, ainsi que les numéros d'accès UniProtKB/Swiss-Prot. Les séquences protéiques bovines et humaines sont alignées par un BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) afin de vérifier leur correspondance. Afin de faciliter la compréhension et l'utilisation de l'information, les protéines sont désignées par le nom de gène humain.

Les données expérimentales intégrées dans l'interactome pour analyser l'effet muscle proviennent de deux contextes :

- LT de bœufs et de taurillons (N = 111)
- ST de bœufs et de taurillons (N = 111)

L'interactome est réalisé en utilisant le logiciel sous licence libre Cytoscape (version 2.6.3), avec le format organique (Shannon *et al* 2003). Les annotations fonctionnelles sont réalisées à partir de la Gene Association file pour *Homo sapiens*, et l'ontologie de la Gene Ontology Full. Les descriptions des mécanismes de la Gene Ontology sont extraites du site AmiGO (<http://www.geneontology.org/>). Les analyses fonctionnelles sont effectuées à l'aide du module de Cytoscape BINGO 2.3 (Maere *et al* 2005). Afin d'étudier plus précisément certaines interactions, ces dernières sont analysées par l'outil STRING (<http://string.embl.de/>) pour consulter la bibliographie associée.



Résultats et Discussion

RESULTATS ET DISCUSSION

I Choix méthodologiques

I.1 Stratégie initiale

Valider une protéine comme marqueur consiste à analyser la relation entre l'abondance de cette protéine et la variabilité du caractère étudié, sur un nombre d'échantillon statistiquement significatif.

La stratégie classique consiste à quantifier chaque protéine par la technique de Western-Blot. La technique de quantification par ELISA n'a pas été retenue, car une mise au point de conditions spécifiques à chaque protéine était nécessaire. Ces mises au point, compte tenu de la trentaine de protéines prévues, auraient pris trop de temps sur la thèse. De plus, certaines protéines sont difficilement quantifiables en ELISA, contrairement au Western-Blot. Ainsi, par son universalité et sa disponibilité, la technique de Western-Blot a été retenue pour réaliser les quantifications de protéines. Ce type de quantification s'effectue par l'utilisation d'un anticorps primaire spécifique de la protéine étudiée, suivi d'une révélation par chimioluminescence ECL.

I.2 Développements techniques

Diverses expérimentations préliminaires réalisées afin de préparer la quantification des protéines ont amené à modifier les protocoles initiaux afin de les optimiser.

I.2.1 Mise au point de la révélation d'anticorps primaire par fluorescence

La technique de révélation classique d'un anticorps primaire est d'utiliser un anticorps secondaire couplé à la peroxidase : c'est le système de révélation par chimioluminescence, ou ECL. L'enzyme catabolise l'oxydation d'un substrat, le luminol, qui va par la suite émettre des photons. Ces derniers viennent ensuite impressionner une plaque photosensible. Ce sont ces impacts qui sont ensuite quantifiés. Les premières quantifications par Western-Blot / ECL ont rapidement posé un problème majeur : la variabilité technique. En effet, les bandes correspondant à une protéine spécifique présentent un aspect très hétérogène en ECL, ressemblant à un haltère (Figure 36A). Les extrémités des bandes sont plus intenses que le

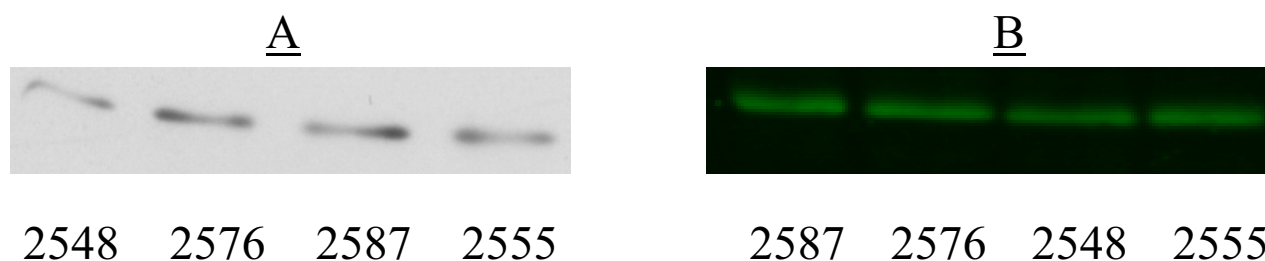


Figure 36. Exemples de signaux obtenus par Western-Blot en ECL et en FLUO sur Hsp27

A. Révélation ECL. Les bandes présentent un aspect en haltère très hétérogène.

B. Révélation FLUO. Les bandes présentent un aspect plus homogène qu'en ECL.

Echantillons	CV% - ECL	CV% - FLUO
2531	36,59	6,96
2533	26,22	9,29
2544	31,23	31,16
2548	36,74	9,11
2555	34,62	11,22
2556	8,09	39,88
2567	89,4	7,25
2576	30	11,68
2582	31,83	10,81
2585	34,25	7,59
2587	58,34	1,17
2588	29,04	11,13
2594	47,41	15,1
2597	51,63	0,97
2604	84,41	12,56
Moyenne des CV%	41,99	12,39

Tableau 12. Coefficients de Variation en % pour différents échantillons en ECL et FLUO lors d'une quantification par Western-Blot sur Hsp27

milieu. Afin de calculer le Coefficient de Variation (CV) technique en % pour chaque échantillon, deux réplicats sont quantifiés par des Western-Blot / ECL différents. La quantification par Western-Blot / ECL de la protéine Hsp27 a été réalisée sur 15 échantillons du programme MUGENE-2003. Les CV% obtenus (Tableau 12) étaient très élevés, présentant une moyenne de 41,99 % sur les 15 échantillons analysés. Certains échantillons présentaient même un CV technique supérieur à 80 %. Cette variation technique s'explique en partie par l'aspect hétérogène des bandes, qui a tendance à fausser le calcul de l'intensité totale de cette dernière par le logiciel d'analyse d'image. Une autre raison provient du système ECL en lui-même : en effet, il s'agit d'une détection très indirecte avec une succession importante d'étape après la fixation de l'anticorps secondaire sur le primaire : la quantité de substrat disponible pour la peroxydase de l'anticorps, l'efficacité de la réaction catalysée par cette dernière, l'émission de photons par le produit, l'impact de ces derniers sur le film photosensible, et enfin la conversion du film en image par un scanner. Le système de révélation ECL, tel qu'il est effectué au laboratoire, était donc inadapté pour des quantifications à grande échelle dans le but de valider des protéines comme marqueur. De plus, la faible sensibilité de la technique, due au film photosensible, rendait difficile (et coûteuse en terme d'anticorps et d'échantillons) la détection de protéines peu abondantes (telles que Hsp40 ou les Hsp70).

Une autre méthode de révélation de l'anticorps primaire devenait donc nécessaire. La technique de révélation par l'utilisation d'anticorps secondaires fluorescents représente une bonne alternative par rapport à l'ECL car elle comporte moins d'étapes, et donc moins de facteur de variabilité. Des comparaisons entre des Western-Blot ECL et Fluorescence (FLUO) ont été effectuées, avec la protéine Hsp27 et sur les 15 échantillons du programme MUGENE-2003 évoqués précédemment, avec deux réplicats provenant de deux Western-Blot différents. Le premier résultat est l'aspect des bandes obtenues (Figure 36B). En effet, ces bandes présentent un aspect homogène, beaucoup plus qu'en ECL, ce qui était de bonne augure pour les quantifications. De manière plus générale, les membranes n'ont presque pas de taches parasites, comme il est courant d'en avoir avec la révélation ECL. Par la suite, les quantifications effectuées ont montré des CV techniques en moyenne 3,5 fois plus faibles qu'en ECL, avec une moyenne de 12,39 % sur les 15 échantillons étudiés contre 41,99 % en ECL (Tableau 12). La raison de cette fiabilité technique est le caractère direct de la révélation. En effet, à partir de la fixation de l'anticorps secondaire sur le primaire, le fluorochrome fixé à l'anticorps émet, après excitation par un laser à 778 nm, un signal fluorescent à 795 nm. C'est l'intensité de ce signal qui est directement quantifiée. Cette grande répétabilité fait de la

révélation par fluorescence une technique de choix pour les quantifications envisagées. De plus, le scanner utilisé pour la fluorescence possède un spectre de détection beaucoup plus large que le film photosensible, ce qui permet de détecter les faibles signaux provenant de protéines peu abondantes.

Cette différence de variabilité technique entre ECL et FLUO est à relativiser selon le différentiel de moyens techniques employés. En effet, la révélation ECL, telle qu'elle est réalisée au laboratoire, utilise un film photosensible. Tandis que la révélation FLUO utilise un scanner à fluorescence. Il s'agit d'un scanner « dernière génération » et par conséquent, beaucoup plus performant qu'une plaque photosensible. En utilisant un détecteur de chimiluminescence de dernière génération, les variations techniques obtenues avec le système ECL devraient être moindres. Cependant, la différence de successions d'étapes entre les deux techniques restant inchangée, le système FLUO demeure le plus fiable des deux (la FLUO ayant moins d'étapes que l'ECL).

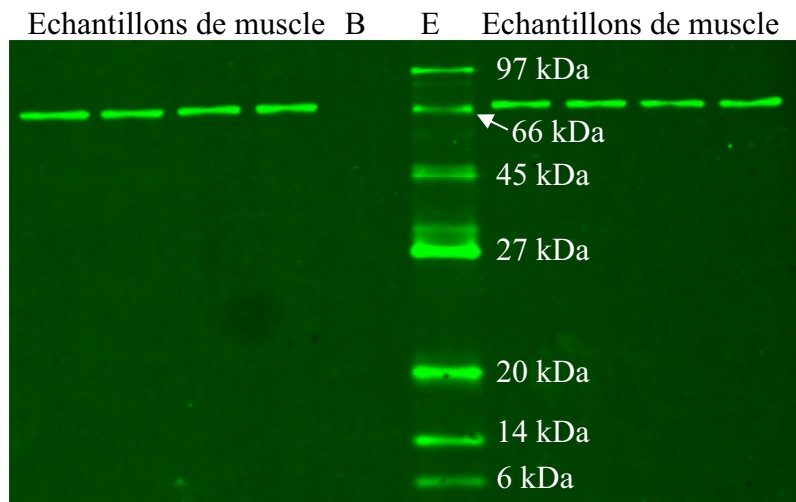
Au regard des résultats obtenus lors de la comparaison des révélications ECL et FLUO, la révélation d'anticorps primaires par fluorescence a été adoptée pour les expérimentations. Ce choix entre ECL et FLUO a fait l'objet d'un poster et d'une présentation orale aux 12^{èmes} Journées Sciences du Muscle et Technologies des Viandes.

I.2.2 Validations de la spécificité des anticorps primaires

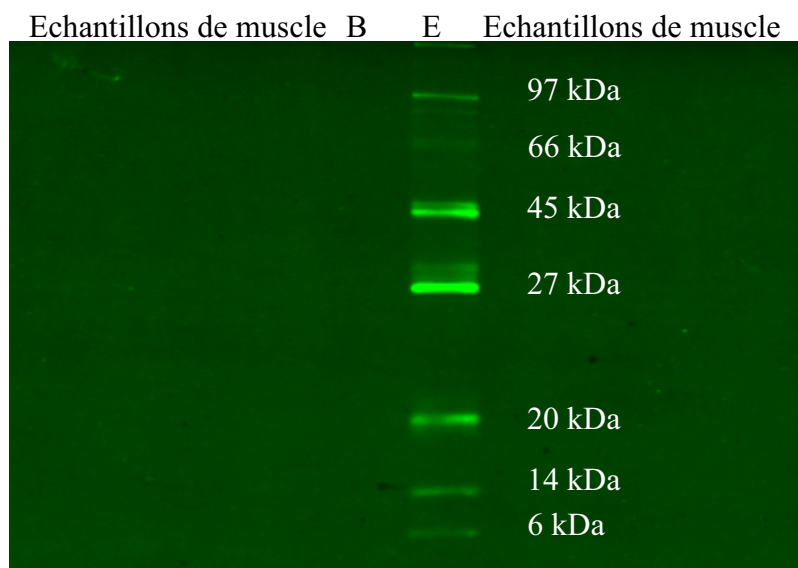
A partir de la liste des 41 protéines considérés comme marqueurs potentiels de la tendreté, 49 anticorps ont été testés pour leur spécificité par Western-Blot, pour en retenir au final 24 (Tableau 13). Par exemple, un Western-Blot avec l'anticorps anti-Hsp70-1A/B (Figure 37A) a montré que cet anticorps est spécifique, par la détection d'une bande unique de taille attendue. Au contraire, les Western-Blot effectués sur l'actine- β (Figure 37B) et la S100-A1 (Figure 37C) ont invalidé l'utilisation de ces anticorps, à cause d'une absence de reconnaissance et d'une fixation aspécifique respectivement. Ces validations ont permis d'optimiser les conditions d'utilisation et les dilutions optimales pour chacun de 24 des anticorps (Tableau 14). Ces 24 anticorps fonctionnels ont permis de sélectionner les 24 protéines à quantifier et à étudier au cours de la thèse.

Marqueur protéique	Anticorps testé	Validation
Actine-β	Beta-actin	Non retenu
Acyl-CoA desaturase	SCD	Non retenu
Acyl-coenzyme A thioesterase 2	ACOT2	Non retenu
ATP synthase Chaîne B	ATP5B	Non retenu
Calpastatine	Calpastatine	Non retenu
CapZβ	CAPZB	Retenu
Caspase 3	CASP3 (Acris)	Non retenu
	Caspase 3 (INRA)	Non retenu
	CASP3 (Interchim)	Non retenu
Caspase 8	CASP8 (Acris)	Non retenu
	CASP8 (Interchim)	Non retenu
Cis-Peroxyredoxine	PRX6	Non retenu
	PRDX6	Retenu
Crystalline α Chaîne B	CRYAB	Retenu
Desmine	Desmine	Retenu
Diacylglycerol O-acyltransferase	DGAT2	Non retenu
DJ-1	PARK7	Retenu
Enolase 1	ENO1 (Abnova)	Non retenu
	ENO1 (Acris)	Retenu
Enolase 3	ENO3	Retenu
Hsp20	Hsp20	Retenu
Hsp27	Hsp27	Retenu
Hsp40	Hsp40-4 KA	Non retenu
	Hsp40-4 SPM	Retenu
Hsp60	Hsp60	Non retenu
Hsp70-1A/B	HSPA1B	Retenu
Hsp70-8	HSP70 BRM22	Retenu
Hsp70-Grp75	Hsp70/GRP75	Retenu
Lactate Deshydrogenase Chaîne B	LDHB	Retenu
Malate Deshydrogenase 1 (cytoplasmique)	MDH1	Retenu
Malate Deshydrogenase 2 (mitochondriale)	MDH2	Non retenu
M-calpaïne	M-calpain	Retenu
Mu-calpaïne	μ-calpain	Retenu
Myosin Binding Protein H	MYPBH	Retenu
Myosin Heavy Chain I (slow)	MYH1	Retenu
Myosin Heavy Chain II (fast)	MyHC-IIa	Retenu
	MyHC-IIa+x	Retenu
Myosin Light Chain 1F	MYL1	Retenu
Myosin Regulatory Light Chain 2	MLC2	Non retenu
NADH	NADH	Non retenu
Phosphoglucomutase	PGM1	Retenu
S100-A1	S100-A1	Non retenu
Super-oxyde Dismutase Cu/Zn	SOD1 (Santacruz)	Non retenu
	SOD1 (Acris)	Retenu
Super-oxyde Dismutase Mitochondriale	SOD3	Non retenu
Triose Phosphate Isomerase	Triose P Isomerase	Non retenu
Tropomyosine 3	TPM3	Non retenu
Troponine T1	TNNT1	Non retenu
Troponine T3	TNNT3	Non retenu

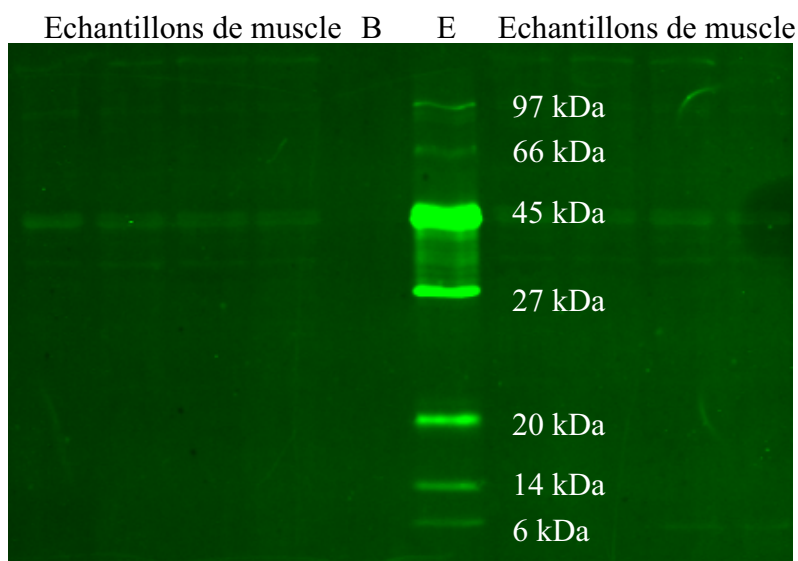
Tableau 13. Anticorps retenus après les validations



A *Hsp70-1A/B* : taille attendue = 70,22 kDa : **validation**



B *Actine-β* : taille attendue = 41,73 kDa : **invalidation**



C *S100-A1* : taille attendue = 10,55 kDa : **invalidation**

Figure 37. Exemples de validation / invalidation d'anticorps primaires

B : Blanc

E : Echelle de poids moléculaire

Nom AC	Forme	Dilution	Conditions	2ème Anticorps	Dilution	Conditions
CAPZB	Monoclonale	1/250	1 heure 30 à 37°C	Anti Mouse LICOR	1/20000	30' 37°C
Crystallin αB	Monoclonale	1/500	1 heure 30 à 37°C	Anti Mouse LICOR	1/20000	30' 37°C
Desmine	Monoclonale	1/250	1 heure 30 à 37°C	Anti Mouse LICOR	1/20000	30' 37°C
DJ-1	Polyclonale	1/250	1 heure 30 à 37°C	Anti Rabbit LICOR	1/20000	30' 37°C
Eno1	Polyclonale	1/2000	1 heure 30 37°C	Anti Rabbit LICOR	1/20000	30' 37°C
Eno3	Monoclonale	1/45000	1 heure 30 à 37°C	Anti Mouse LICOR	1/20000	30' 37°C
Hsp20	Monoclonale	1/200	1 heure 30 à 37°C	Anti Mouse LICOR	1/20000	30' 37°C
HSP27	Monoclonale	1/3000	1 heure 30 à 37°C	Anti Mouse LICOR	1/20000	30' 37°C
HSP40-4	Monoclonale	1/250	1 heure 30 à 37°C	Anti Mouse LICOR	1/20000	30' 37°C
HSP70 (HSPA8)	Monoclonale	1/250	1 heure 30 à 37°C	Anti Mouse LICOR	1/20000	30' 37°C
HSP70/GRP75	Monoclonale	1/250	1 heure 30 à 37°C	Anti Mouse LICOR	1/20000	30' 37°C
HSPA1B (Hsp70prot1B)	Monoclonale	1/2000	1 heure 30 à 37°C	Anti Mouse LICOR	1/20000	30' 37°C
LDHB	Monoclonale	1/50000	1 heure 30 37°C	Anti Rabbit LICOR	1/20000	30' 37°C
M-calpaïne	Monoclonale	1/1000	1 heure 30 à 37°C	Anti Mouse LICOR	1/20000	30' 37°C
MDH1 cytoplasmique	Monoclonale	1/1000	1 heure 30 à 37°C	Anti Sheep LICOR	1/20000	30' 37°C
MyBP-H	Monoclonale	1/4000	1 heure 30 à 37°C	Anti Mouse LICOR	1/20000	30' 37°C
MYL1	Polyclonale	1/1000	1 heure 30 à 37°C	Anti Mouse LICOR	1/20000	30' 37°C
Myosine IIx 8F4	Monoclonale	1/500	1 heure 30 à 37°C	Anti Mouse LICOR	1/20000	30' 37°C
Myosine lente 5B9	Monoclonale	1/2000	1 heure 30 à 37°C	Anti Mouse LICOR	1/20000	30' 37°C
Myosine rapide 15F4	Monoclonale	1/4000	1 heure 30 à 37°C	Anti Mouse LICOR	1/20000	30' 37°C
PGM1	Monoclonale	1/8000	1 heure 30 à 37°C	Anti Mouse LICOR	1/20000	30' 37°C
PRDX6	Monoclonale	1/500	1 heure 30 37°C	Anti Mouse LICOR	1/20000	30' 37°C
SOD1	Polyclonale	1/1000	1 heure 30 37°C	Anti Rabbit LICOR	1/20000	30' 37°C
μ-calpaïne	Monoclonale	1/1000	1 heure 30 à 37°C	Anti Mouse LICOR	1/20000	30' 37°C

Tableau 14. Conditions d'utilisation en quantification des 24 anticorps retenus

I.2.3 Mise au point du Dot-Blot de quantification de protéines

Un aspect limitant s'est vite imposé lors de la quantification par Western-Blot d'une trentaine de protéines sur plus de 100 échantillons différents : la durée. En effet, réaliser de telles quantifications, avec 3 ou 4 réplicats par échantillon, auraient pris plus de 3 années complètes entièrement consacrées aux Western-Blot. L'ELISA ne représentant pas une solution alternative adaptable à toutes les protéines étudiées, une autre technique a été recherchée, adaptable à toutes les protéines étudiées, aussi fiable que le Western-Blot, mais plus rapide. Une alternative au Western-Blot est le Dot-Blot, technique couramment utilisée pour étudier les ARN, et qui présente des caractéristiques proches d'une puce à ARN. Nous avons cherché des références bibliographiques utilisant et validant cette technique dans le cadre de quantifications de protéines. Dans le même temps, divers tests ont été entrepris afin de savoir si cette technique était réalisable avec le matériel de Western-Blot à disposition. Les résultats favorables ont donc encouragé à utiliser le Dot-Blot. Cependant, aucune référence bibliographique validant une technique de Dot-Blot pour quantifier des protéines n'avait été trouvée. Nous avons donc mis au point et validé un protocole de Dot-Blot dans ce sens, en utilisant la révélation par fluorescence. La technique a été présentée pour la première fois à l'International Symposium for Young Scientists, suite à quoi elle a fait l'objet d'une publication dans le Journal of Physiology pour quantifier des protéines.

Article Journal of Physiology and Pharmacology

N. GUILLEMIN¹, B. MEUNIER¹, C. JURIE¹, I. CASSAR-MALEK¹, J-F. HOCQUETTE¹, H. LEVEZIEL², B. PICARD¹

VALIDATION OF A DOT-BLOT QUANTITATIVE TECHNIQUE FOR LARGE SCALE ANALYSIS OF BEEF TENDERNESS BIOMARKERS

¹Institute for Agricultural Research (INRA), UR1213, Herbivore Research Unit, Muscle Growth and Metabolism Group, Clermont-Ferrand/Theix Research Center, F-63122 Saint Genes Champanelle, France; ²Institute for Agricultural Research (INRA), UMR1061, Animal Molecular Genetics Unit, University of Limoges, IFR145, Sciences and Technique Faculty, F-87060 Limoges, France.

Beef tenderness is a very complex and multifactorial sensorial meat quality trait, which depends partly on muscle characteristics. This tissue is very variable according to animal type (age, breed and sex) and rearing conditions. Consequently, beef tenderness exhibits a great variability. Different research programs have revealed several genes or proteins which could be good markers of beef tenderness. In order to validate the relation of these markers with beef tenderness on a large population of bovines, it is necessary to have a large-scale and trusty technique which can access different quantities of proteins related to tenderness. In this study we firstly compared Western-Blot and Dot-Blot. Secondly, we evaluated Dot-Blot technical and biological capabilities for the quantification of protein biomarkers. The results demonstrated that the Dot-Blot technique with fluorescence detection presents numerous interests. This technique allows a good reproducibility and permits the simultaneous analysis of a large number of samples. The Dot-Blot technique defined and validated in this study can be used for protein biomarkers analyses, notably to predict beef tenderness. Another major result of this study is that about 5 to 10 animals per group are required to detect large differences (>1.5) in biomarker expression between tender and tough beef, whereas much larger numbers of animals (10 to 30) are required to detect smaller differences (about 1.2 to 1.3) taking into account the biological variability of these markers.

Key words: *Dot-Blot, validation, large-scale analysis, biomarkers, protein quantification, immunology*

INTRODUCTION

Beef is important in the human diet and represents an important economical sector in different countries including France (1). Consumers attempt high sensorial meat quality, especially tenderness (2). This meat quality trait depends on muscle which is a very complex tissue. Indeed, muscles characteristics like collagen and lipid contents, fibre types contribute to a great extent to the variation in beef tenderness (3).

In order to access to the variation in tenderness, several programs (4), based on biochemistry, proteomics, transcriptomics and genetics, have generated a list of at least thirty potential beef tenderness biomarkers, at protein (5), RNA (6) and DNA levels (4). These potential biomarkers have been revealed by comparisons of animals groups which differ in the quality of the meat they produce.

Larger analyses, on different muscles, animal types and breeds, are necessary to confirm the roles of these thirty biomarkers in the determinism of tenderness. This validation step presented in this article concerns the protein level, in order to develop in the future a protein prediction test for beef tenderness. For this, it is crucial to dispose of a reliable and large-scale analysis technique for protein quantification.

To perform that kind of large-scale protein validation, some quantitative immunological techniques are available such as Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Protein-array, or

Dot-Blot immunoassay. The ELISA technique is a fast quantitative method based on a solid support. For example it has been employed in the determination of the type I Myosin Heavy Chain in bovine muscle (7). However the weak point of ELISA is that technical conditions must be defined for each specific antibody used. In the case of around thirty biomarkers to validate, it would require too much time to establish specific conditions for each marker. This is the reason why we did not selected ELISA for the validation of tenderness potential markers. Protein microarrays were developed to study protein-protein interaction (8). Recently, some improvements of the technique allowed protein quantification (9) and opened new ways to determine protein quantities in a large scale analysis, notably for cancer or bacteriology researches. So, Protein-arrays represent a good alternative for this study. However, the preliminary step before protein quantification is to validate the specificity of antibodies used on bovine muscles. This is routinely realised by Western-Blot. So, the chosen technique for protein quantification must be more similar as possible to Western-Blot, to be sure that antibody will react with the same specificity in the high throughput technique as in Western-Blot. This is not the case for Protein-array, which have technical conditions (the support, incubation time and antibody utilisation) quite different from those of Western-Blot. This is the reason why Protein-arrays were not selected for this study.

Dot-Blot immunoassay was developed in 1982 (10) based on RNA Dot-Blot, and validated for large-scale absence/presence

screening of protein markers in bacteriology, immunology and epidemiology researches. ELISA has been developed and technically validated 10 years before Dot-Blot for protein quantification, and is nowadays a currently used technique. Because of technical specifications like proteins solubility, some studies used Dot-Blot instead of ELISA (11). As exposed previously, the validation of an important number of different proteins require usage of Dot-Blot instead of ELISA for also technical and time-consuming reasons. Moreover, the Dot-Blot technique is very similar to Western-Blot, and is a compromise between the advantages of Protein-array approach and those of Western-Blot technique. As antibody conditions (dilutions, incubation-time) are similar in Dot-Blot and Western-Blot, the antibody specificity can be guaranteed in a Dot-Blot quantification after a Western-Blot validation of the antibody, like the methodology employed by Duffy *et al.* (12). For all these reasons, the Dot-Blot technique was chosen for this study.

Because of the poor rate of Dot-Blot usage for protein quantification, there is no technical and biological validation of Dot-Blot except for a precise use in a study context for one or two proteins analysed (12, 13). So the validation of several different protein markers requires a more global Dot-Blot validation.

This article presents the technical and biological validation of Dot-Blot as a large-scale technique for protein quantification from bovine muscle total protein extraction. To achieve this goal, we have determined the inter- and intra- assay variability of Dot-Blot and the inter-assay variability of Western-Blot (Study 1), and the Dot-Blot response for proteins of different characteristics (Study 2). We also present the biological validation of the Dot-blot technique by demonstrating its capability to detect a well known muscle effect according the literature (Study 3). Finally, we illustrate a Dot-Blot application for the large scale validation of beef tenderness biomarkers (Study 4).

MATERIALS AND METHODS

Chemical agents and apparatus

Acrylamide, bisacrylamide, TEMED, ammonium persulfate were from Amersham (Uppsala, Sweden). Chemical reagents, including urea, thiourea, DTT and CHAPS were from Sigma (St. Louis, MO, USA). The Mini-Protean electrophoresis apparatus and the Trans-Blot Cell were from Biorad (Hercules, CA, USA). The Minifold I Dot-Blot was from Schleicher&Schuell Bioscience (Germany). The Odyssey Scanner was from LI-COR Biosciences (Lincoln, Nebraska, USA). The technical assays were conducted with three antibodies corresponding to three potential markers of beef tenderness according to previous results: Heat Shock Protein 27 (14), Phosphoglucosmutase and Myosin Binding Protein-H (15). Antibodies: anti-PGM and anti-MyBP-H were from Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA), anti-Hsp27 was from AbNOVA (Taipei, Taiwan). Antibodies specificities were guaranteed on human proteins by manufacturers. Secondary fluorescent antibody was from LI-COR Biosciences (Lincoln, Nebraska, USA).

Animals and samples

This study was conducted with 18 Charolais young bulls from the INRA experimental program MUGENE (funded by ANR and APIS-GENE through the GENANIMAL call). All the animals were slaughtered at 15 or 19 months of age at the slaughterhouse of INRA in compliance with the current ethical guidelines for animal welfare. Muscle samples from *longissimus thoracis* (LT) and *semitendinosus* (ST) were excised from each animal within 15 minutes after slaughter. Muscle samples were

immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until protein extraction. The tenderness value for each sample was accessed by mechanical (Warner-Bratzler test) analysis on cooked meat as described in Lepetit and Culioli (16).

Total protein extractions were performed according to Bouley *et al.* (17) from 13 LT and 8 ST frozen muscles from young bulls in the denaturation extraction buffer (8.3M urea, 2M thiourea, 1% DTT, 2% CHAPS). The protein concentration was determined by spectrophotometry with Bradford assay (18). Protein extractions were stored at -20°C. A standard sample was constituted by mixing all samples from young bulls.

Western-Blot membrane

Western-blot analysis were performed according to the method previously described (19, 20) and slightly modified. Briefly, fifteen micrograms of total protein extraction sample were separated in 1-D in a 12% polyacrylamide gel at 120 V, at 4°C for 90 minutes in Mini-Protean apparatus. Proteins were transferred to a PVDF membrane with Trans-Blot Cell apparatus at 210 mA at 4°C for 60 minutes. Membrane was blocked in a 10% milk blocking buffer at 37°C for 20 minutes and then incubated with the primary antibody. Infrared fluorescence detection was then used for protein quantification.

Dot-Blot membrane

Fifteen micrograms of total protein extraction sample were deposited on a nitrocellulose membrane with Minifold I Dot-Blot apparatus. All samples were deposited by random order on the 96-spots membrane. In addition, three protein quantities of the mixed standard sample (7.5 µg, 15 µg, 22.5 µg) were deposited for data normalization. The Dot-Blot membrane was air-dried for 5 minutes, and blocked in a 10% milk blocking buffer at 37°C for 20 minutes and then incubated with the primary antibody. Infrared fluorescence detection was then used for protein quantification.

Antibodies incubations

The specificity for each antibody used on bovine muscle was checked by a Western-Blot with 15 µg of total protein extraction from bovine LT muscle per well, with a fluorescence detection at 800 nm. The specificity was accessed by the detection of a single band corresponding to the theoretical molecular weight of the protein studied, like the method used by Duffy *et al.* (12). The molecular weight was determined by the Western-Blot with Biorad Kaleidoscope ladder which emitted fluorescence at 700 nm. The Fig. 1 showed an example of this specificity validation on bovine muscle for antibody anti-Hsp27 at 800 nm. After this step of validation, antibodies can be used on bovine muscle as follow.

The Western-Blot and Dot-Blot membranes were incubated at 37°C during 90 minutes with the following concentrations (initial concentration/appropriate dilution): MyBP-H (1000 µg/mL/1:4000), Hsp27 (200 µg/mL/1:3000), and PGM (1000 µg/mL/1: 8000). Then the membranes were incubated at 37°C for 30 minutes with the anti-mouse fluorochrome-conjugated LICOR-antibody IRDye 800CW (1 mg/mL). The first and second antibodies were diluted in 1% milk blocking buffer.

Image analyses and protein quantification

All Western-Blot and Dot-Blot were scanned with the Odyssey NIR imager, using the 800 nm laser, a 169 µm spatial resolution and a fixed gain of 5. This infrared fluorescence detection was characterised as a quantitative and sensitive technique for protein quantification with a consistent linear range (21).

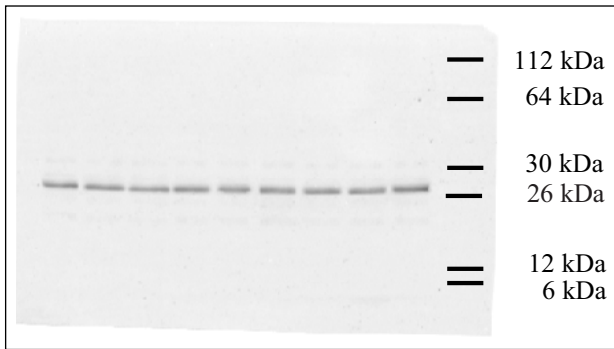


Fig. 1. Specificity of the human antibody anti-Hsp27 checked by Western-Blot. Western-Blot was done with 15 µg of total protein extraction from bovine muscle per well, with a fluorescence detection at 800 nm as described in the Material and Methods. Specificity of the antibody was checked by the detection of a single band corresponding to the theoretical molecular weight of Hsp27 from bovine (27kDa). Molecular weight was accessed by the Biorad Kaleidoscope ladder, which emitted fluorescence at 700 nm and added artificially on the picture. Similar results were obtained for the other antibodies.

Western-Blot images were quantified under ImageQuant TL v2003 (Amersham) and each band volume was normalized using total band volumes present on the membrane as previously described to assay collagen types (22). Dot-Blot images were quantified under GenePix PRO v6.0 (Axon) (Fig. 2). Each dot volume was calculated as total dot intensity minus median local background value multiplied by dot area. Because Dot-Blot offers the possibility of replicates, a data-prefiltering approach was implemented to eliminate outlier values mainly due to dust. As generally recommended in microarray analysis (23), the outliers exclusion technique based on the Medium Absolute Difference (MAD) was applied before repeated values were averaged. Finally, to make the data comparable between assay, the data were normalized using a regression-approach based on the three available standards. This technique is also generally recommended for gene expression studies (24). Thus all results were made on normalized volume and expressed in arbitrary units and are representing relative protein amount.

Statistical analyses

Inter or intra-assay variation was expressed as coefficients of variation (CV) which is calculated as standard deviation divided by the mean and expressed as a percentage of the mean (study 1). The percentage of technical variability (R^2) was calculated by studying the linearity of the Dot-Blot response (study 2). The significance of

difference between biological groups was performed by Student *t*-test (study 3). Finally power calculation was conducted taking into account a significance level (α) of 5% and a test of power (1- β) of 80% (22). This allows sample size determination for future large scale biomarkers validation (study 4).

RESULTS

Technical validation: inter- and intra-assay Dot-Blot variability; comparison with inter-assay Western-Blot variability (study 1)

Technical validation was realised with samples of LT muscle, and the membranes of Western-Blot and Dot-Blot were incubated with anti-Hsp27 antibody. To calculate inter-assay variability of Western-Blot, two membranes of Western-Blot were made, with the same 8 samples of LT muscle. The two membranes were incubated separately with the first antibody, and then simultaneously for infrared fluorescence detection. The CV between the two membranes for each sample was calculated to assess the inter-assay variability of Western-Blot. The coefficient of variation for each band between the two Western-Blot membranes was on average 8.7% with standard deviation of 6.5% (Table 1). To calculate inter-assay variability of Dot-Blot, two membranes of Dot-Blot were made separately, each with the same 5 samples of LT muscle. Each sample was 6-time replicated on a Dot-Blot membrane. The random deposit order was strictly the same for the two membranes. The coefficient of variation between the two membranes for each spot was calculated to access the inter-assay variability of Dot-Blot, and compared with Western-Blot inter-assay variability. The coefficient of variation for each spot between the two Dot-Blot membranes was on average 10% with standard deviation of 4.5% (Table 1). To calculate intra-assay variability of Dot-Blot, one membrane of Dot-Blot was made with 8 samples of LT muscle. Each sample was 6-time replicated. The coefficient of variation of each sample between its 6 technical replications was calculated to access the intra-assay variability of Dot-Blot. The coefficient of variation between the six technical replicates of each sample was on average 9% with standard deviation of 4.7% (Table 1).

Technical validation: linearity of Dot-Blot response for proteins of different characteristics (study 2)

Three Dot-Blot membranes were made in the same conditions, with the mixed sample at different total protein quantities: 7.5 µg, 15 µg, and 22.5 µg total protein extraction and a blank with 4 µl of extraction buffer. All these samples were 4-time replicated on the membranes. Three proteins were chosen for their different characteristics in terms of molecular weight, tri-

Table 1. Inter-assay technical variability of Western-Blot and inter- and intra- assay technical variability of Dot-Blot.

		Number of assay	Number of animals	Average CV (+/- SD%)	Number of animals	Number of samples per animal	Average CV% (+/- SD%)
1	Western-Blot	2	8	8.7 (+/- 6.5)			
2	Dot-Blot	2	5	10 (+/- 4.5)	8	6	9 (+/- 4.7)

CV = Coefficient of Variation; SD = Standard Deviation. For inter-assay variability CV for each animal was calculated according to its two values generated by the both assays in Western-Blot and Dot-Blot (data not shown). The mean of the animals CV was calculated to generate a mean CV (+/-SD%) for inter-assay technical variability for Western-Blot and Dot-Blot. For intra-assay technical variability, CV of each animal was calculated according to its six values generated by the Dot-Blot (data not shown). The mean of the 8 animals CV was calculated to generate a mean CV (+/-SD%) for intra-assay variability for Dot-Blot.

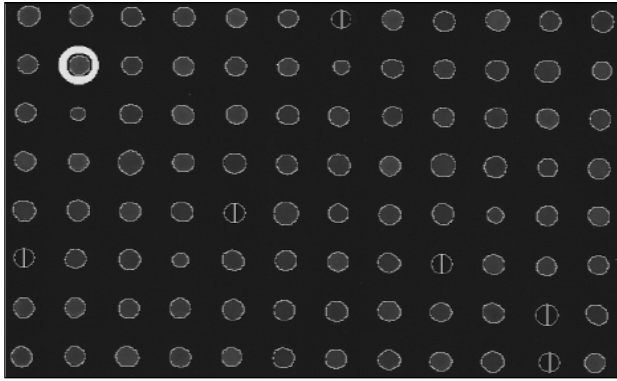


Fig. 2. Image of a 96-well Dot-Blot analyzed by the software GenePix. An example of the local background calculation on a white circle is showed for a spot.

dimensional structure, composition and cellular abundance: Hsp27, MyBP-H, and PGM. Each membrane was incubated with one antibody against one of these proteins. After data-prefiltering by MAD technique, 84%, 87% and 98% of spots were retained respectively for Hsp27, MyBP-H and PGM. The linearity of Dot-Blot response for proteins of different characteristics was then accessed by the linear regression between average dot volume and total protein quantities for Hsp27, MyBP-H and PGM. For the three studied proteins, dot volume was linearly correlated with the total amount of protein, $R^2=0.99$, 0.97 and 0.99 for Hsp27, MyBP-H and PGM respectively (Fig. 3). Consequently, for these three different proteins, the response of Dot-Blot technique, namely fluorescence intensity, was linearly correlated with total protein amounts.

Biological validation: detection of a known muscle effect (study 3)

Some studies, using immunoblotting techniques and cited by Gilbert *et al.* (25), have demonstrated that MyBP-H protein content was higher in fast twitch muscles, like the ST muscle, than in low twitch muscles, like the LT muscle (26). In order to

check the ability of Dot-Blot to detect this known muscle effect on MyBP-H expression, a Dot-Blot was made with 13 samples from LT muscle and 8 samples from ST muscle. Each sample was four-time replicated. Membrane was incubated with the antibody anti-MyBP-H. MyBP-H amount for each muscle was calculated. Then, comparisons between each muscle were done by a Student *t*-test. The amount of MyBP-H in ST muscle was significantly greater than in LT muscle (1.4-fold, $P < 0.05$), which was in accordance with bibliographic data (data not shown).

Application: beef tenderness biomarker large-scale validation (study 4)

Biomarkers of interest were generally found by proteomics and transcriptomics approaches in small-scale experiments with a small number of animals. Consequently, a pilot study was conducted on two beef potential tenderness biomarkers (Hsp27 and MyBP-H) with a low sample size. This allows estimation of intra-group standard deviation and between group differences to calculate statistical power (27) and estimate requirement in terms of sample size (22, 28). So, Dot-Blot membranes were made in the same way, with 8 samples of LT muscle and 8 samples of ST muscle. Each sample was four-time replicated on a membrane. Membranes were incubated with antibodies anti-Hsp27 and anti-MyBP-H. For each muscle (LT and ST), 2 groups of 4 samples were constituted according to the tenderness score (high or low). Table 2 depicts the average intra-group CV (for biological variability) with Dot-Blot and the observed relative difference between groups which both allowed sample size estimation for each condition. Thus, only six LT samples per group of tenderness would be necessary to obtain a statistically significant result with Hsp27 when not less than forty LT samples per group would be necessary with MyBP-H. Interestingly intra-group biological variability appears similar for both muscles (Table 2). A generalization of this power analysis is thus illustrated in Fig. 4. Here, we reported the relationship between sample size and desired effect for Hsp27 (CV% is about 18.9% whatever the studied muscle) and for MyBP-H (CV% is about 40.5% whatever the studied muscle). For a desired effect superior to the biological variability, the sample size keeps behind 17 but increases exponentially for lower desired effect (Fig. 4).

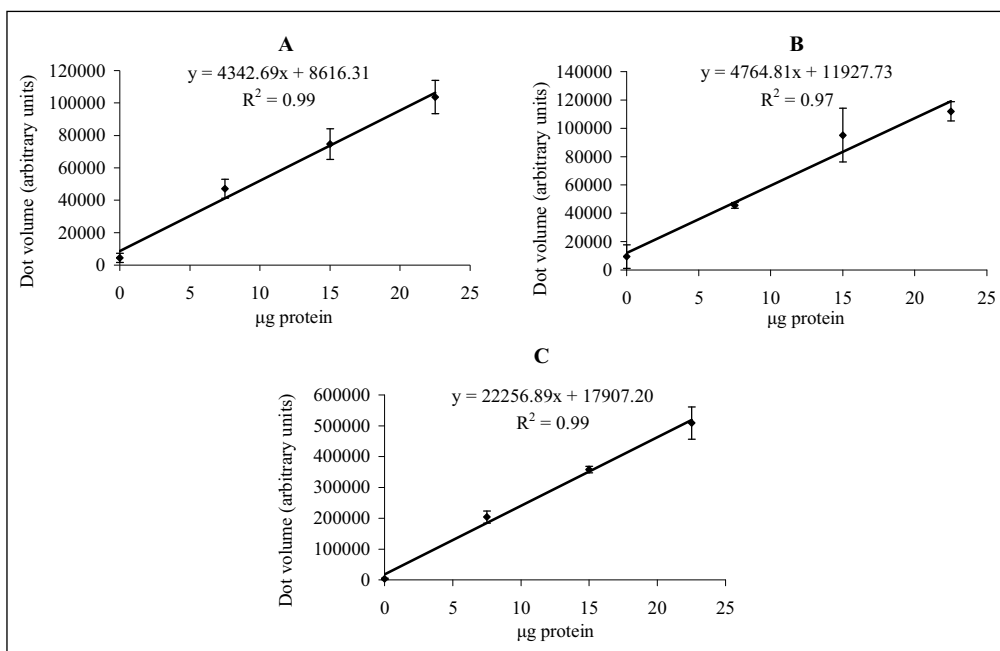


Fig. 3. Relationship between dot volume and total protein quantities for Hsp27 (A), MyBP-H (B) and PGM (C) proteins

Table 2. Sample size estimation for Hsp27 and MyBP-H to detect a significant difference between animal groups.

	Hsp27		MyBP-H	
	LT	ST	LT	ST
Observed intra group mean variability (CV%)	18.4	19.4	39.7	41.4
Observed group difference (%)	30.7	30.3	25.3	62.2
Required Sample size	6	7	40	7

A pilot study was conducted with two tenderness biomarkers (Hsp27 and MyBP-H) and with 4 samples per group of tenderness in two muscles (LT, ST). Intra-group standard deviation and between group differences of mean (expressed as % of mean) are reported and entered statistical power calculation using the T-test formula to estimate sample size required to detect with confidence the observed differences. Thus 40 samples per group would be necessary to detect significantly the observed difference of 25% in MyBP-H amount in LT muscle, but only 6 to 7 animals for the other cases.

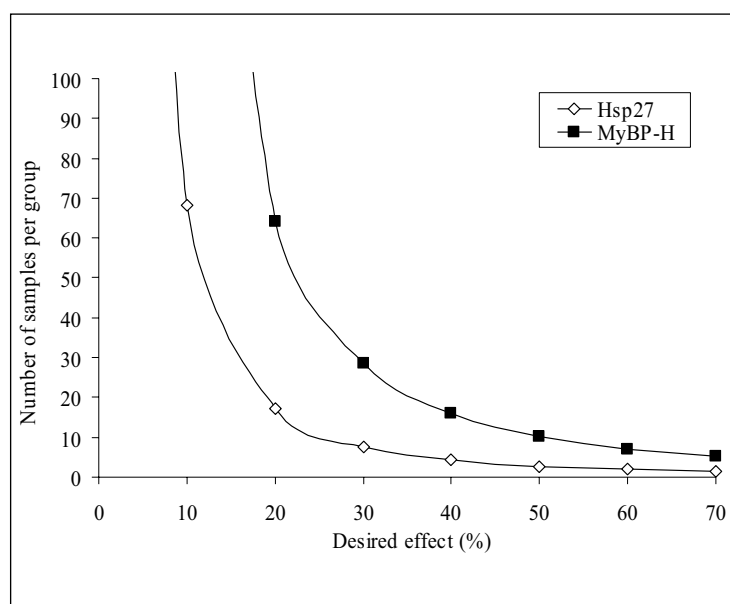


Fig. 4. Variation in sample size required to detect significant differences in Hsp27 and MyBP-H amounts depending of the expected differences to be detected.

The number of animals per group to detect a significant difference between two animal groups was calculated according to the desired effect to be detected for two biomarkers (Hsp27, MyBP-H) in bovine muscle taken into account the biological variability which differs for the two markers. A pilot study (Table 2) was conducted on the two tenderness biomarkers (Hsp27 and MyBP-H) to determine intra-group standard deviation (*i.e.* the biological variability which was 19 and 40% for Hsp27 and MyBP-H respectively). The expected differences between group means (*i.e.* the desired effect to be detected expressed as % of mean) and the biological variability entered statistical power calculation to estimate required sample size. Thus about 30 samples per group are necessary to detect a significant difference of 30% in MyBP-H protein content, but only less than 10 animals are necessary to detect a significant difference of 30% in Hsp27 due to the lower biological variability of this second marker.

DISCUSSION

In this study, we demonstrated that the Dot-Blot is a useful immunological technique which can be used routinely for the analyses of proteins potentially markers of beef tenderness on large populations of samples with a good technical reproducibility.

The analysis of inter-assay variability of the two techniques in study 1 showed a similar and acceptable technical coefficient of variation (9% for Western-Blot and 10% for Dot-Blot). These results are comparable to those of Duffy *et al.* (12), with an inter-assay Dot-Blot variability of 20%.

Dot-Blot uses similar technical conditions than Western-Blot, in terms of antibodies quantities and incubation-time, to ensure the same antibody specificity between the two experiments. Western-Blot is a classical technique usually used for the study and quantification of proteins. So, as Dot-Blot is as reliable as Western-Blot, the Dot-Blot appears to be a good technique for protein quantification. Moreover, the intra-assay variability of Dot-Blot was 9%, similar to 10 % of inter-assay variation. These results are comparable to those of Duffy *et al.*, with an intra-assay Dot-Blot variability of 10%. So, Dot-Blot has no technical bias and allows analysis of different spots of the same sample distributed among the membrane. In Dot-Blot, proteins are not previously separated according to their molecular weight, contrary to Western-Blot. So, a possible limitation of Dot-Blot could be the accessibility of the protein by the primary antibody. Low steric size proteins could be masked

by high steric size proteins on the spot surface, and so the primary antibody can not find its epitope. The same problem could be observed between low and high represented proteins, especially for this muscular samples, where 20% of the total protein mass is represented by actin only (29).

The Dot-Blot experiments on three proteins (Hsp27, MyBP-H and PGM) which differ according to their molecular weight, composition, three-dimensional structure and cellular abundance, showed in the study 2, that there were no technical limitations for Dot-Blot with a large spectrum of different proteins, from small size heat shock proteins to bigger enzymes. Moreover, the spot intensity was linearly correlated with the different total protein quantities used (up to 22.5 µg), without saturation or latency. So, Dot-Blot was proportional for these different quantities and can be employed for quantification with 15 µg of total protein samples. This quantity is usually used in Western-Blot to have a good representation of muscle proteins. To reproduce the Western-Blot technical conditions, 15 µg of total proteins were also used for Dot-Blot quantification. The results of Dot-Blot experiment in the study 3 with MyBP-H revealed a significant difference between ST and LT muscle, where MyBP-H quantity was higher in ST than in LT. These results were in accordance with data cited from Gilbert *et al.* (25). So we can conclude that Dot-Blot was able to detect a known protein quantity difference between two muscles.

In the case of beef tenderness marker, the desired effects we want to observe between two tenderness groups are generally about 20 or 30% of magnitude. To be statistically significant, the

marker effect must be analysed on a sufficient number of samples per group. This number can be calculated by a power analysis using the T-test formula. This power analysis showed that the number of required samples per group depends on the biological variation of the studied marker and on the magnitude of the effect to be detected. Therefore, for a desired effect of 20% with a marker intra-group variability of 20% observed in the study 4, like Hsp27, the required sample size group is 20. The same desired effect with a marker intra-group variability of 40%, like MyBP-H would require a sample size group of 60. So, assessment of these markers requires large-scale analysis, which is a strong advantage of Dot-Blot. This technique allows indeed the analysis of the number of samples recommended by the power analysis to have statistically significant results, rapidly and easily.

The large-scale abilities of Dot-Blot allow a higher number of samples to be analysed in one experiment compared to the Western-Blot technique. These have some consequences in terms of results, because a large range of data is generated within the same experimental conditions (antibodies quantities, hybridization and revelation time). These have also an economical impact, because an experiment of Dot-Blot uses fewer amounts of antibodies and buffers, and is faster and easier compared to Western-Blot. The large-scale abilities of Dot-Blot are however limited by the number of samples deposited on membrane. Automatic membrane made by robot could enhance the large-scale capacities of Dot-Blot. Because proteins are not previously separated according to their molecular weight and isoelectric point, it is not possible with Dot-Blot to distinguish and quantify specific isoforms of proteins like in proteomics. The Dot-Blot technique is a global protein approach less sensitive than bi-dimensional electrophoresis or RT-PCR. Results from Dot-Blot are thus complementary with those of proteomics, transcriptomics and genetics approaches.

In conclusion, this work demonstrates that Dot-Blot is technically as reliable as a Western-Blot, which is a standard technique employed for validation of protein biomarkers, for a large spectrum of different proteins. In case of large-scale analysis requirement, Dot-Blot represents a good and complementary tool for protein biomarker validation. So, Dot-Blot is well-adapted for our tenderness biomarker validation study. In any case, the number of samples to be analysed must be previously calculated according to the biological variability of the studied biomarkers with potentially large differences between markers.

Acknowledgements: The PhD grant of N. Guillemin is provided by INRA and Région Auvergne. This work is funding by the National Agency of Research (ANR) and APIS-GENE for the MUGENE program (through the AGENAE/GENANIMAL call). Thanks to Christiane Barboiron and Nicole Dunoyer for their technical assistance, Daniel Taillandier for fluorescent detection assistance, and the INRA experimental farms of Bourges (for young bull production) and the experimental slaughter house of our Unit for animal slaughter and muscle sampling. The authors also thank Jacques Lepetit (INRA, QuaPa Unit, Theix) for the measurement of shear force on beef samples and Gilles Renand (INRA, SGQA Unit, Jouy-en-Josas) for the conception of the experimental design of the MUGENE program.

Conflict of interest statement: None declared.

REFERENCES

- Veyssat P, Bebin D, Lherm M. Adaptation to Agenda 2000 (CAP reform) and optimisation of the farming system of French suckler cattle farms in the Charolais area: a model-based study. *Agr Syst* 2005; 83(2): 179-202.
- Geay Y, Bauchart D, Hocquette JF, Culioli J. Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. *Reprod Nutr Dev* 2001; 41(1): 1-26.
- Dransfield E, Martin JF, Bauchart D *et al.* Meat quality and composition of three muscles from French cull cows and young bulls. *Anim Sci* 2003; 76: 387-399.
- Hocquette JF, Lehnert SA, Barendse W, Cassar-Malek I, Picard B. Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. *Animal* 2007; 1: 159-173.
- Bouley J, Meunier B, Chambon C, De Smet S, Hocquette JF, Picard B. Proteomic analysis of bovine skeletal muscle hypertrophy. *Proteomics* 2005; 5(2): 490-500.
- Bernard C, Cassar-Malek I, LeCunff M, Dubroeuq H, Renand G, Hocquette JF. New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. *J Agric Food Chem* 2007; 55(13): 5229-5237.
- Picard B, Leger J, Robelin J. Quantitative-determination of type-I myosin heavy-chain in bovine muscle with antimyosin monoclonal-antibodies. *Meat Sci* 1994; 36(3): 333-343.
- MacBeath G, Schreiber SL. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science* 2000; 289(5485): 1760-1763.
- Loebke C, Sultmann H, Schmidt C *et al.* Infrared-based protein detection arrays for quantitative proteomics. *Proteomics* 2007; 7(4): 558-564.
- Hawkes R, Niday E, Gordon J. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal Biochem* 1982; 119(1): 142-147.
- Yamada N, Ozawa S, Kageyama N, Miyano H. Detection and quantification of protein residues in food grade amino acids and nucleic acids using a Dot-Blot fluorescent staining method. *J Agric Food Chem* 2004; 52(17): 5329-5333.
- Duffy LK, Scofield E, Rodgers T, Patton M, Bowyer RT. Comparative baseline levels of mercury, Hsp 70 and Hsp 60 in subsistence fish from the Yukon-Kuskokwim delta region of Alaska. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1999; 124(2): 181-186.
- De Lisle RC. A quantitative dot-blot immunoassay for integral membrane proteins: preparation of pancreatic plasma membranes containing apical and basolateral domains. *Anal Biochem* 1991; 192(1): 1-5.
- Morzel M, Terlouw C, Chambon C, Micol D, Picard B. Muscle proteome and meat eating qualities of Longissimus thoracis of "Blonde d'Aquitaine" young bulls: A central role of HSP27 isoforms. *Meat Sci* 2008; 78(3): 297-304.
- Bouley J. Analyse protéomique du muscle de Bovin appliquée à la recherche de marqueurs de la tendreté de la viande. *Rencontre Recherches Ruminants* 2004; Paris; pp. 87-89.
- Lepetit J, Culioli J. Mechanical properties of meat. *Meat Sci* 1994; 36(1-2): 203-237.
- Bouley J, Chambon C, Picard B. Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 2004; 4(6): 1811-1824.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
- Hocquette JF, Graulet B, CastigliaDelavaud C, Bornes F, Lepetit N, Ferre P. Insulin-sensitive glucose transporter transcript levels in calf muscles assessed with a bovine GLUT4 cDNA fragment. *Int J Biochem Cell Biol* 1996; 28(7): 795-806.

20. Chaze T, Meunier B, Chambon C, Jurie C, Picard B. In vivo proteome dynamics during early bovine myogenesis. *Proteomics* 2008; 8(20): 4236-4248.
21. Schutz-Geschwender A, Zhang Y, Holt T, McDermitt D, Olive D. Quantitative, two-color Western Blot detection with infrared fluorescence. *LI-COR Biosciences* 2004; www.licor.com.
22. Listrat A, Hocquette JF. Analytical limits of total and insoluble collagen content measurements and of type I and III collagen analysis by electrophoresis in bovine muscles. *Meat Sci* 2004; 68(1): 127-136.
23. Le Meur N, Lamirault G, Bihouée A *et al.* A dynamic, web-accessible resource to process raw microarray scan data into consolidated gene expression values: importance of replication. *Nucleic Acids Res* 2004; 32(18): 5349-5358.
24. Hocquette JF, Brandstetter AM. Common practice in molecular biology may introduce statistical bias and misleading biological interpretation. *J Nutr Biochem* 2002; 13(6): 370-377.
25. Gilbert R, Cohen JA, Pardo S, Basu A, Fischman DA. Identification of the A-band localization domain of myosin binding proteins C and H (MyBP-C, MyBP-H) in skeletal muscle. *J Cell Sci* 1999; 112(1): 69-79.
26. Totland GK, Kryvi H. Distribution patterns of muscle fibre types in major muscles of the bull (*Bos taurus*). *Anat Embryol (Berl)* 1991; 184(5): 441-450.
27. Lenth RV. Statistical power calculations. *J Anim Sci* 2007; 85: 24-29.
28. Mera R, Thompson H, Prasad C. How to calculate sample size for an experiment: a case-based description. *Nutr Neurosci* 1998; 1: 87-91.
29. Dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M *et al.* Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev* 2003; 83(2): 433-473.

Received: November 5, 2008.

Accepted: April 15, 2009.

Author's address: Nicolas Guillemim, MSc, Institute for Agricultural Research (INRA), UR1213, Herbivore Research Unit, Muscle Growth and Metabolism Group, Clermont-Ferrand/Theix Research Center, F-63122, France; e-mail: nicolas.guillemim@clermont.inra.fr

Cette étude de validation du Dot-Blot s'est déroulée en 4 points.

Premier point : comparaison du CV technique du Dot-Blot à celui du Western-Blot.

Le Western-Blot étant considéré comme une technique de référence pour la quantification de protéines, son CV a servi de base pour comparer et juger le CV du Dot-Blot. Afin de pouvoir utiliser cette technique pour quantifier les protéines de façon fiable et répétable, son CV devait être du même ordre que celui du Western-Blot. Le CV du Western-Blot a été calculé à 8,7 % entre deux quantifications réalisées par deux Western-Blot sur un même échantillon, pour la protéine Hsp27 servant de référence. De manière identique, le CV du Dot-Blot a été calculé à 10 %. Le CV entre différents réplicats d'un échantillon au sein d'une même membrane de Dot-Blot a été calculé à 9 %. Le calcul de CV montre que le Dot-Blot est donc aussi fiable et répétable que le Western-Blot, que ce soit au sein de la même membrane ou entre différentes expérimentations.

Deuxième point : qualité des résultats du Dot-Blot sur des protéines différentes.

Une grande interrogation était de savoir si le Dot-Blot était applicable sur des protéines de nature très différentes. Ainsi, la linéarité de la réponse du Dot-Blot à trois protéines a été calculée. Ces trois protéines sont Hsp27, Myosin Binding Protein-H et Phosphoglucose mutase. Ces trois protéines sont différentes selon leur masse moléculaire, leur conformation et leur abondance cellulaire. Les résultats de cette partie ont montré que l'intensité du signal fluorescent obtenu était proportionnelle à la quantité de protéines totales déposée, et ce pour les trois protéines. Ceci montre que le Dot-Blot, appliqué à des protéines différentes, est fiable et stable.

Troisième point : détection d'un effet muscle connu.

La protéine Myosin Binding Protein-H est connue pour être plus abondante dans des muscles à contraction rapide tels que le ST, que dans des muscles à contraction lente, tels que le LT (Gilbert *et al* 1999). Afin de vérifier si la méthodologie du Dot-Blot permet de détecter un effet biologique, la quantité de MyBP-H a été déterminée dans 21 échantillons (13 de LT et 8 de ST). Les résultats confirment une quantité de MyBP-H significativement plus grande dans le ST que dans le LT. Ainsi, la méthodologie Dot-Blot est considérée comme fiable pour détecter des effets biologiques.

Quatrième point : validation à grande échelle de biomarqueurs protéiques.

Un calcul de puissance (Lenth 2007) a été effectué à partir des variabilités biologiques de deux protéines, Hsp27 et MyBP-H, obtenues lors de quantifications par Dot-Blot. Ce calcul permet de connaître combien d'échantillons par groupe sont nécessaires afin de détecter des différences significatives entre ces groupes. Ainsi, plus une protéine présente une variabilité

biologique élevée, plus le nombre d'échantillons à analyser par groupe doit être important. Pour détecter une différence de 30 % entre deux groupes (seuil d'effet recherché pour les marqueurs de tendreté), les effectifs de chacun doivent être inférieur à 10 pour Hsp27, et de 30 pour MyBP-H. Le Dot-Blot, par sa grande capacité d'analyse, trouve ainsi tout son intérêt dans la validation de protéines comme marqueurs, car cette technique est capable d'analyser des effectifs significatifs en un nombre minimal d'expérimentations. Cela permet en outre de diminuer les variabilités inter-expérimentations, et donc d'obtenir des résultats plus fiables.

Le Dot-Blot est donc une technique présentant un avantage considérable en terme de rapidité et de capacité d'analyse, tout en étant aussi fiable et reproductible que le Western-Blot, technique de référence pour la quantification de protéines. Une autre caractéristique intéressante du Dot-Blot est son coût, très inférieur à celui d'un Western-Blot, en terme de produits et d'anticorps.

Ainsi, pour la réalisation des quantifications de protéines au cours de la thèse, cette technique de Dot-Blot (Figure 38), couplée à la révélation par fluorescence, a été retenue.

I.3 Optimisation du protocole de Dot-Blot

Par la suite, le protocole de Dot-Blot a été optimisé au fur et à mesure depuis les validations techniques publiées dans l'article du *Journal of Physiology and Pharmacology*, pour aboutir à une version finale du protocole de Dot-Blot présenté en annexe.

II Résultats techniques sur l'utilisation du Dot-Blot

L'utilisation de la technique de Dot-Blot sur l'ensemble de l'effectif MUGENE des années 2003 et 2005 a permis d'apprécier l'efficacité du Dot-Blot. Les différentes qualités d'appréciation sont l'erreur relative de la mesure, la vitesse et le coût de la technique.

L'erreur relative de mesure a été évaluée en comparant la valeur théorique du mélange de normalisation, déposé pour 15 µg de protéines totales, égale à 15, et la moyenne des valeurs expérimentales de chacun des échantillon constituant ce mélange. Cette moyenne doit être de 15 si la technique était parfaite, sans erreur. Cette erreur a été calculée pour les 24 protéines séparément, puis la moyenne de ces pourcentages a été utilisée comme référence de la

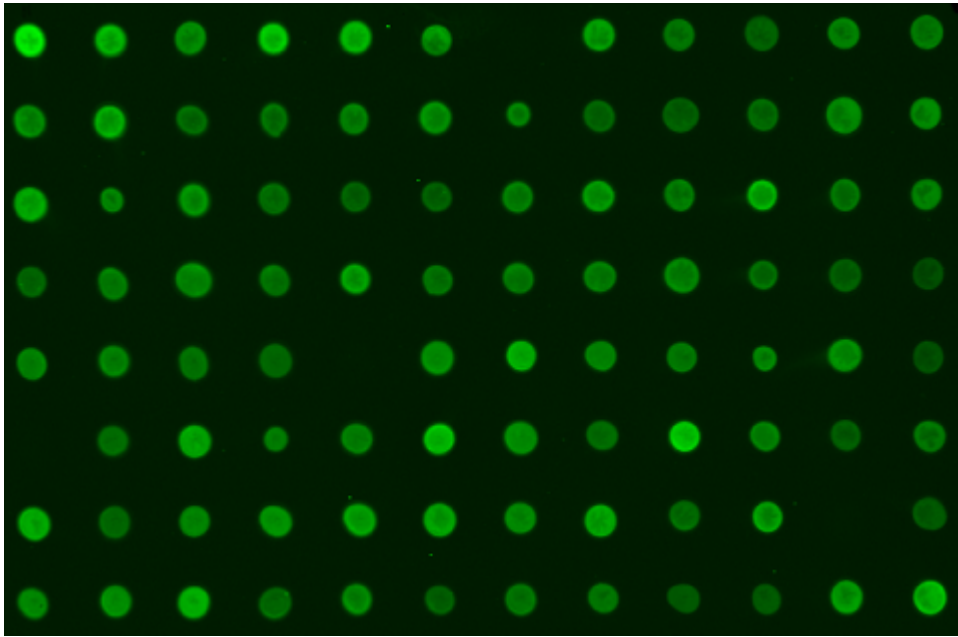


Figure 38. Illustration d'une quantification par Dot-Blot de la protéine Hsp20

technique pour l'ensemble du travail. Ainsi, cette erreur de mesure relative du Dot-Blot est de 9 %. C'est-à-dire que la technique permet de quantifier une protéine donnée avec une erreur de 9 % par rapport à la quantité vraie. Ce pourcentage n'est cependant pas uniforme et dépend de la protéine étudiée. En effet, la plus faible erreur de mesure est celle de la M-calpaïne, à 0,14 %. La plus forte est celle de la Myosine-IIx avec 31 %. Cette différence selon les protéines indique que la technique est dépendante de la fixation de l'anticorps primaire, mono- ou poly-clonal. De manière générale, l'ensemble des facteurs de variation de la technique (dosage des protéines, dépôts, quantifications) n'affecte que peu la quantification, puisque l'erreur relative de la mesure reste inférieure à 10 %. Ceci confirme que le Dot-Blot est une technique très fiable, plus que les techniques de quantifications de protéines classiquement utilisées (ELISA ou gels-2D, avec 25 à 30 % d'erreur relative).

Un autre intérêt de cette technique est sa vitesse, due à sa capacité d'analyse à grande échelle ainsi qu'une relative simplicité technique. Ainsi, la quantification des 222 échantillons étudiés au cours de cette thèse aurait dû prendre environ 4 mois. Le Dot-Blot est donc 14 fois plus rapide que le Western-Blot.

Un avantage qui a pesé dans l'intérêt du Dot-Blot est son coût d'exécution. Le coût des quantifications pour les 24 protéines sur les 222 échantillons a été estimé en prenant en compte le coût des 24 anticorps primaires, l'anticorps secondaire, et la membrane. Ainsi, les quantifications en Dot-Blot ont coûté environ 4 fois moins cher qu'en Western-Blot.

Ainsi, l'utilisation du Dot-Blot dans ma thèse, pour quantifier l'ensemble des 222 échantillons de MUGENE, en 4 réplicats pour les 24 protéines (soit plus de 20 000 données), a montré que cette technique est non seulement rapide et peu onéreuse, mais également très fiable. C'est par cette technique de Dot-Blot qu'a été obtenu l'ensemble des données brutes qui ont été analysées dans cette thèse (Tableaux 15 et 16). Ces données ont été utilisées pour étudier d'une part, les effets du muscle et du type d'animal sur l'abondance des protéines d'intérêt, et d'autre part les relations entre ces protéines et la tendreté.

III Effets muscle et type d'animal

Les quantifications effectuées sur l'ensemble des données des cohortes 2003 et 2005 du programme MUGENE, sur les 24 protéines considérées, ont montré qu'il existe une influence

Animal	Type	Muscle	Hsp70	αB-crystalline	Hsp40	Hsp20	Hsp90-1A	Hsp90-B	PGC	DnaJme	MLC-1F	Cap-β	Myo-Calpain	p-Calpain	Emo-3	Hsp70-G345	D2-1	NDH1	MyHC-I	MyHC-II	SCD1	Emo				
01528	Beef	L.T	18.27	12.93	13.84	15.41	17.82	12.18	11.81	12.87	12.23	13.73	12.52	16.02	17.04	14.03	13.56	14.00	16.01	14.13	12.77	10.04	12.63			
01529	Beef	L.T	18.27	12.93	13.84	15.41	17.82	12.18	11.81	12.87	12.23	13.73	12.52	16.02	17.04	14.03	13.56	14.00	16.01	14.13	12.77	10.04	12.63			
01530	Beef	L.T	18.27	12.93	13.84	15.41	17.82	12.18	11.81	12.87	12.23	13.73	12.52	16.02	17.04	14.03	13.56	14.00	16.01	14.13	12.77	10.04	12.63			
01541	Beef	L.T	10.71	13.80	13.88	13.64	15.60	16.14	15.33	13.90	13.68	12.27	11.45	14.34	14.62	11.68	13.22	14.34	14.82	13.12	13.38	9.43	12.96			
01549	Beef	L.T	8.90	10.58	10.58	13.57	14.26	14.88	21.45	12.16	13.23	13.64	11.19	12.95	13.42	15.15	13.30	14.54	13.65	14.34	14.82	13.07	12.07	12.35	15.44	18.71
01551	Beef	L.T	12.41	22.28	18.22	18.28	16.23	23.84	15.57	12.43	15.18	16.52	14.90	13.91	16.01	16.78	13.74	16.04	15.00	16.31	14.02	14.10	18.28	16.42	13.48	44.11
01552	Beef	L.T	18.56	13.42	13.98	15.75	12.72	15.55	14.65	14.33	13.27	14.34	9.02	14.96	13.96	16.18	14.03	14.91	15.62	12.73	13.64	13.63	14.40	13.42	14.85	3.50
01554	Beef	L.T	13.80	22.06	20.44	20.19	16.74	22.99	16.15	18.01	13.89	16.73	14.52	15.99	16.31	16.48	15.35	17.65	16.59	12.55	13.65	13.65	18.34	15.38	18.59	14.59
01555	Beef	L.T	13.80	22.06	20.44	20.19	16.74	22.99	16.15	18.01	13.89	16.73	14.52	15.99	16.31	16.48	15.35	17.65	16.59	12.55	13.65	13.65	18.34	15.38	18.59	14.59
01557	Beef	L.T	14.63	13.30	10.94	13.77	14.32	12.08	13.66	14.74	12.58	14.06	17.75	11.92	14.45	12.95	14.66	13.19	12.36	12.24	12.31	14.64	11.82	13.53	10.40	6.55
01573	Beef	L.T	25.01	10.57	16.34	10.94	14.39	13.55	17.49	13.55	17.49	13.55	17.49	13.55	17.49	13.55	17.49	13.55	17.49	13.55	17.49	13.55	17.49	13.55	17.49	13.55
01574	Beef	L.T	15.41	17.82	18.35	19.40	15.98	4.37	17.16	15.70	19.20	20.12	18.87	18.75	20.09	15.57	18.56	18.80	16.31	16.58	16.07	20.04	13.18	16.63	10.46	16.81
01578	Beef	L.T	15.41	17.82	18.35	19.40	15.98	4.37	17.16	15.70	19.20	20.12	18.87	18.75	20.09	15.57	18.56	18.80	16.31	16.58	16.07	20.04	13.18	16.63	10.46	16.81
01580	Beef	L.T	11.90	19.68	14.49	14.88	17.94	18.57	14.20	13.57	13.59	12.82	14.75	10.40	15.53	11.28	14.71	13.74	12.82	13.83	9.63	18.12	12.37	17.25	38.80	
01581	Beef	L.T	11.90	19.68	14.49	14.88	17.94	18.57	14.20	13.57	13.59	12.82	14.75	10.40	15.53	11.28	14.71	13.74	12.82	13.83	9.63	18.12	12.37	17.25	38.80	
01586	Beef	L.T	12.15	20.48	23.72	19.59	15.35	23.10	22.21	18.25	20.19	18.08	18.18	15.55	17.25	16.96	18.91	17.29	17.03	17.07	18.23	23.48	29.92	19.92	19.92	
01587	Beef	L.T	12.15	20.48	23.72	19.59	15.35	23.10	22.21	18.25	20.19	18.08	18.18	15.55	17.25	16.96	18.91	17.29	17.03	17.07	18.23	23.48	29.92	19.92	19.92	
01588	Beef	L.T	10.68	12.65	01588	15.59	15.16	9.78	11.09	14.94	12.75	14.95	15.31	16.70	14.61	17.07	16.00	14.53	16.34	16.55	18.46	13.77	15.40	12.95	13.93	19.64
01593	Beef	L.T	12.02	16.44	14.18	15.15	15.34	15.76	15.21	15.34	13.35	13.44	14.40	15.33	19.78	14.86	17.18	13.32	13.42	13.63	13.76	13.94	17.08	10.00	8.91	
01596	Beef	L.T	13.58	17.69	16.04	14.12	17.71	13.67	14.99	17.22	14.55	13.44	14.81	15.20	17.60	16.57	19.38	16.76	17.14	15.24	16.18	13.63	17.96	14.43	13.46	
01599	Beef	L.T	9.84	15.13	12.61	15.17	12.10	12.79	16.01	14.49	14.20	14.83	12.19	15.44	15.51	17.30	15.45	14.20	14.43	15.76	15.76	16.25	11.54	10.61	6.49	
01600	Beef	L.T	10.40	15.56	15.23	17.29	13.00	22.61	18.30	13.53	13.47	14.74	13.98	13.07	13.74	13.98	13.07	12.29	12.55	12.92	13.66	14.49	13.42	14.41	14.02	6.08
01604	Beef	L.T	11.46	18.08	14.40	16.19	13.15	16.64	15.80	15.58	13.40	14.22	12.78	13.55	14.45	12.26	12.61	10.93	13.26	13.59	12.36	12.24	12.31	14.64	11.82	13.53
01611	Beef	L.T	11.25	23.83	17.78	20.94	17.26	21.02	19.56	13.70	14.51	21.25	18.48	20.65	22.69	15.69	21.31	26.65	15.55	20.42	18.76	12.04	15.05	14.97	12.48	6.01
01612	Beef	L.T	11.25	23.83	17.78	20.94	17.26	21.02	19.56	13.70	14.51	21.25	18.48	20.65	22.69	15.69	21.31	26.65	15.55	20.42	18.76	12.04	15.05	14.97	12.48	6.01
01613	Beef	L.T	11.58	18.17	15.86	16.67	16.46	7.60	16.67	14.44	15.34	15.05	13.89	16.55	15.25	17.28	17.36	16.97	17.43	16.19	15.63	13.35	16.46	14.09	6.65	
01614	Beef	L.T	11.58	18.17	15.86	16.67	16.46	7.60	16.67	14.44	15.34	15.05	13.89	16.55	15.25	17.28	17.36	16.97	17.43	16.19	15.63	13.35	16.46	14.09	6.65	
01615	Beef	L.T	12.60	22.83	18.00	13.04	15.27	44.71	16.55	13.71	15.72	16.50	16.31	16.31	16.31	16.31	16.31	16.31	16.31	16.31	16.31	16.31	16.31	16.31	16.31	16.31
01616	Beef	L.T	12.60	22.83	18.00	13.04	15.27	44.71	16.55	13.71	15.72	16.50	16.31	16.31	16.31	16.31	16.31	16.31	16.31	16.31	16.31	16.31	16.31	16.31	16.31	16.31
01617	Beef	L.T	12.29	28.00	01617	12.27	21.37	16.89	20.50	18.14	15.91	22.42	15.73	16.26	16.09	17.87	17.86	12.92	16.88	17.94	15.94	16.91	38.80	14.53	14.54	8.73
01646	Beef	L.T	10.29	15.04	16.20	10.65	12.62	20.24	12.24	13.18	14.29	16.40	14.16	14.88	14.87	17.61	15.83	16.24	13.99	15.85	14.19	13.44	18.43	14.32	14.32	14.32
01646	Beef	L.T	10.29	15.04	16.20	10.65	12.62	20.24	12.24	13.18	14.29	16.40	14.16	14.88	14.87	17.61	15.83	16.24	13.99	15.85	14.19	13.44	18.43	14.32	14.32	14.32
01646	Beef	L.T	10.29	15.04	16.20	10.65	12.62	20.24	12.24	13.18	14.29	16.40	14.16	14.88	14.87	17.61	15.83	16.24	13.99	15.85	14.19	13.44	18.43	14.32	14.32	14.32
01646	Beef	L.T	10.29	15.04	16.20	10.65	12.62	20.24	12.24	13.18	14.29	16.40	14.16	14.88	14.87	17.61	15.83	16.24	13.99	15.85	14.19	13.44	18.43	14.32	14.32	14.32
01646	Beef	L.T	10.29	15.04	16.20	10.65	12.62	20.24	12.24	13.18	14.29	16.40	14.16	14.88	14.87	17.61	15.83	16.24	13.99	15.85	14.19	13.44	18.43	14.32	14.32	14.32
01646	Beef	L.T	10.29	15.04	16.20	10.65	12.62	20.24	12.24	13.18	14.29	16.40	14.16	14.88	14.87	17.61	15.83	16.24	13.99	15.85	14.19	13.44	18.43	14.32	14.32	14.32
01646	Beef	L.T	10.29	15.04	16.20	10.65	12.62	20.24	12.24	13.18	14.29	16.40	14.16	14.88	14.87	17.61	15.83	16.24	13.99	15.85	14.19	13.44	18.43	14.32	14.32	14.32
01646	Beef	L.T	10.29	15.04	16.20	10.65	12.62	20.24	12.24	13.18	14.29	16.40	14.16	14.88	14.87	17.61	15.83	16.24	13.99	15.85	14.19	13.44	18.43	14.32	14.32	14.32
01646	Beef	L.T	10.29	15.04	16.20	10.65	12.62	20.24	12.24	13.18	14.29	16.40	14.16	14.88	14.87	17.61	15.83	16.24	13.99	15.85	14.19	13.44	18.43	14.32	14.32	14.32
01646	Beef	L.T	10.29	15.04	16.20	10.65	12.62	20.24	12.24	13.18	14.29	16.40	14.16	14.88	14.87	17.61	15.83	16.24	13.99	15.85	14.19	13.44	18.43	14.32	14.32	14.32
01646	Beef	L.T	10.29	15.04	16.20	10.65	12.62	20.24	12.24	13.18	14.29	16.40	14.16	14.88	14.87	17.61	15.83	16.24	13.99	15.85	14.19	13.44	18.43	14.32	14.32	14.32
01646	Beef	L.T	10.29	15.04	16.20	10.65	12.62	20.24	12.24	13.18	14.29	16.40	14.16	14.88	14.87	17.61	15.83	16.24	13.99	15.85	14.19	13.44	18.43	14.32	14.32	14.32
01646	Beef	L.T	10.29	15.04	16.20	10.65	12.62	20.24	12.24	13.18	14.29	16.40	14.16	14.88	14.87	17.61	15.83	16.24	13.99	15.85	14.19	13.44	18.43	14.32	14.32	14.32
01646	Beef	L.T	10.29	15.04	16.20	10.65	12.62	20.24	12.24	13.18	14.29	16.40	14.16	14.88	14.87	17.61	15.83	16.24	13.99	15.85	14.19	13.44	18.43	14.32	14.32	14.32
01646	Beef	L.T	10.29	15.04	16.20	10.65	12.62	20.24	12.24	13.18	14.29	16.40	14.16	14.88	14.87	17.61	15.83	16.24	13.99	15.85	14.19	13.44	18.43	14.32	14.32	14.32
01646	Beef	L.T	10.29	15.04	16.20	10.65	12.62	20.24	12.24	13.18	14.29	16.40	14.16	14.88	14.87	17.61	15.83	16.24	13.99	15.85	14.19	13.44	18.43	14.32	14.32	14.32
01646	Beef	L.T	10.29	15.04	16.20	10.65	12.62	20.24	12.24	13.18	14.29	16.40	14.16													

Animal	Type	Muscle	Rep2-7	off-crystalline	Hept4-8	Hept4-8	Hept4-1B	MyoB-H	PCM	Densité	MLC-I+IF	Cmp2-B	Mc-Choline	PRDX6	α-Caldesmon	Endotex 3	Hept4-GRPs	Dr-1	MDIH	MyH-C-1	MyH-C-2	SOD1	LDHB	Enol	MyH-C-1b
01511	Beauf	ST	10.07	8.33	14.44	17.53	10.77	13.96	13.96	15.55	13.83	16.97	17.25	16.97	16.59	14.30	16.96	14.94	17.59	18.05	16.09	16.69	17.67	31.70	
01512	Beauf	ST	10.07	8.33	14.44	17.53	10.77	13.96	13.96	15.55	13.83	16.97	17.25	16.97	16.59	14.30	16.96	14.94	17.59	18.05	16.09	16.69	17.67	31.70	
01513	Beauf	ST	11.57	9.68	17.02	20.32	13.96	14.18	14.18	18.83	18.21	16.45	17.38	16.45	16.70	16.73	17.38	16.73	20.39	18.07	17.58	18.10	16.38	48.82	
01541	Beauf	ST	12.37	6.59	12.93	18.79	11.94	15.66	14.18	18.83	18.21	16.45	17.38	16.45	16.70	16.73	17.38	16.73	20.39	18.07	17.58	18.10	16.38	48.82	
01549	Beauf	ST	7.28	5.98	12.26	15.16	11.44	12.06	10.83	13.86	12.61	21.08	18.34	20.22	15.92	17.72	16.14	16.64	17.75	17.36	17.75	23.23	24.98	43.56	
01551	Beauf	ST	10.54	9.87	18.63	17.31	12.60	15.59	9.89	25.21	21.98	26.08	24.96	28.94	28.34	22.26	20.48	20.51	21.37	22.99	20.23	18.57	14.27	24.28	
01552	Beauf	ST	9.41	5.46	11.34	12.04	11.34	12.04	11.34	12.04	11.34	12.04	11.34	12.04	11.34	12.04	11.34	12.04	11.34	12.04	11.34	12.04	11.34	12.04	
01553	Beauf	ST	9.41	5.46	11.34	12.04	11.34	12.04	11.34	12.04	11.34	12.04	11.34	12.04	11.34	12.04	11.34	12.04	11.34	12.04	11.34	12.04	11.34	12.04	
01554	Beauf	ST	9.41	5.46	11.34	12.04	11.34	12.04	11.34	12.04	11.34	12.04	11.34	12.04	11.34	12.04	11.34	12.04	11.34	12.04	11.34	12.04	11.34	12.04	
01555	Beauf	ST	9.10	5.61	11.91	13.71	8.45	9.03	9.94	11.77	12.48	13.91	17.09	16.00	15.80	17.99	14.82	15.42	15.47	14.95	19.78	14.91	15.02	35.71	
01557	Beauf	ST	7.96	7.90	12.55	13.61	9.04	12.77	11.16	11.89	12.62	13.62	14.37	13.50	12.48	11.74	10.81	12.45	11.86	14.01	13.08	12.09	11.41	10.62	
01573	Beauf	ST	6.82	6.20	12.33	15.39	9.31	8.61	12.64	11.56	11.43	14.76	16.50	15.40	15.61	19.03	13.95	15.97	13.44	17.46	15.20	18.45	16.75	11.10	
01578	Beauf	ST	9.80	10.29	13.47	15.64	9.21	12.14	13.56	13.08	14.52	16.15	14.81	14.65	14.91	14.80	15.08	15.79	13.87	15.15	15.87	12.91	17.03	17.03	
01580	Beauf	ST	9.80	10.29	13.47	15.64	9.21	12.14	13.56	13.08	14.52	16.15	14.81	14.65	14.91	14.80	15.08	15.79	13.87	15.15	15.87	12.91	17.03	17.03	
01581	Beauf	ST	8.32	8.65	12.52	13.91	8.98	8.73	12.56	11.64	14.60	15.80	15.82	16.29	20.11	18.12	19.28	17.14	13.73	13.59	11.37	14.48	14.20	22.70	
01586	Beauf	ST	8.32	7.97	12.88	13.87	9.14	13.86	14.61	13.44	17.68	15.51	18.56	10.79	13.70	13.19	13.58	13.68	16.07	11.27	16.53	12.87	9.80	10.52	
01588	Beauf	ST	11.10	12.59	15.66	17.24	13.50	13.95	16.53	16.03	12.91	15.63	16.63	20.77	10.87	24.68	17.03	17.54	18.25	15.62	15.38	12.85	14.85	14.30	
01593	Beauf	ST	9.28	6.72	10.49	14.19	10.63	11.24	12.60	13.47	13.08	17.69	16.60	15.49	9.27	16.59	16.80	17.41	15.33	15.97	15.84	15.06	13.84	12.95	
01594	Beauf	ST	9.28	6.72	10.49	14.19	10.63	11.24	12.60	13.47	13.08	17.69	16.60	15.49	9.27	16.59	16.80	17.41	15.33	15.97	15.84	15.06	13.84	12.95	
01599	Beauf	ST	35.60	13.20	14.01	15.91	10.66	11.23	14.05	12.63	13.86	12.72	12.36	14.34	12.31	13.86	13.35	14.52	14.24	13.07	11.11	13.33	12.05	10.73	
01603	Beauf	ST	7.79	7.29	10.60	14.38	9.84	10.98	14.29	13.21	14.13	12.68	10.83	14.72	11.51	13.22	11.89	16.10	14.39	8.89	16.50	14.89	10.62	10.69	
01604	Beauf	ST	8.92	9.01	12.04	14.71	9.08	12.12	14.73	15.08	13.25	22.12	15.19	16.05	19.38	18.14	16.90	16.65	16.43	16.36	16.98	16.49	12.49	21.84	
01611	Beauf	ST	9.08	11.16	13.98	15.13	9.68	10.24	10.24	12.11	14.13	15.71	13.93	12.54	17.52	13.98	13.78	14.84	13.33	13.17	11.09	11.33	9.52	9.09	
01612	Beauf	ST	9.08	11.16	13.98	15.13	9.68	10.24	10.24	12.11	14.13	15.71	13.93	12.54	17.52	13.98	13.78	14.84	13.33	13.17	11.09	11.33	9.52	9.09	
01619	Beauf	ST	12.96	9.51	14.65	19.11	10.62	9.47	7.60	17.76	14.69	15.21	17.37	16.25	17.23	15.64	18.14	20.23	18.48	15.80	16.02	16.13	14.00	24.05	
01633	Beauf	ST	9.44	11.01	10.334	15.27	9.20	11.45	9.83	16.83	13.46	15.52	17.18	15.67	17.17	17.21	16.84	10.63	15.42	18.92	13.88	15.12	14.95	11.10	
01634	Beauf	ST	9.44	11.01	10.334	15.27	9.20	11.45	9.83	16.83	13.46	15.52	17.18	15.67	17.17	17.21	16.84	10.63	15.42	18.92	13.88	15.12	14.95	11.10	
01640	Beauf	ST	13.91	23.20	16.46	20.66	11.41	13.37	10.68	17.38	16.01	16.87	17.93	21.88	16.57	19.49	20.53	20.39	17.37	21.54	14.33	16.45	15.89	13.45	
01641	Beauf	ST	13.91	23.20	16.46	20.66	11.41	13.37	10.68	17.38	16.01	16.87	17.93	21.88	16.57	19.49	20.53	20.39	17.37	21.54	14.33	16.45	15.89	13.45	
01649	Beauf	ST	9.80	3.33	10.69	16.47	7.55	9.38	9.29	15.48	15.44	18.18	15.28	15.28	15.28	15.28	15.28	15.28	15.28	15.28	15.28	15.28	15.28	15.28	
01659	Beauf	ST	8.02	4.53	10.15	16.50	7.54	9.10	15.50	13.90	16.63	16.80	16.73	18.76	17.25	15.52	16.83	16.40	15.41	13.57	16.63	14.35	18.35	14.89	
01660	Beauf	ST	8.02	4.53	10.15	16.50	7.54	9.10	15.50	13.90	16.63	16.80	16.73	18.76	17.25	15.52	16.83	16.40	15.41	13.57	16.63	14.35	18.35	14.89	
01661	Beauf	ST	6.00	4.61	9.01	9.88	8.66	10.02	14.37	11.97	14.43	13.42	11.78	13.43	14.83	15.14	13.49	13.73	16.20	11.76	16.31	12.93	15.01	13.22	
01663	Beauf	ST	6.44	6.59	12.57	13.68	6.57	11.27	9.98	11.18	12.77	14.86	15.33	14.39	18.22	15.47	14.55	14.66	15.62	15.37	15.93	15.99	14.32	8.69	
01665	Beauf	ST	6.44	6.59	12.57	13.68	6.57	11.27	9.98	11.18	12.77	14.86	15.33	14.39	18.22	15.47	14.55	14.66	15.62	15.37	15.93	15.99	14.32	8.69	
01666	Beauf	ST	6.44	6.59	12.57	13.68	6.57	11.27	9.98	11.18	12.77	14.86	15.33	14.39	18.22	15.47	14.55	14.66	15.62	15.37	15.93	15.99	14.32	8.69	
01667	Beauf	ST	6.44	6.59	12.57	13.68	6.57	11.27	9.98	11.18	12.77	14.86	15.33	14.39	18.22	15.47	14.55	14.66	15.62	15.37	15.93	15.99	14.32	8.69	
01668	Beauf	ST	6.44	6.59	12.57	13.68	6.57	11.27	9.98	11.18	12.77	14.86	15.33	14.39	18.22	15.47	14.55	14.66	15.62	15.37	15.93	15.99	14.32	8.69	
01669	Beauf	ST	6.44	6.59	12.57	13.68	6.57	11.27	9.98	11.18	12.77	14.86	15.33	14.39	18.22	15.47	14.55	14.66	15.62	15.37	15.93	15.99	14.32	8.69	
01670	Beauf	ST	6.44	6.59	12.57	13.68	6.57	11.27	9.98	11.18	12.77	14.86	15.33	14.39	18.22	15.47	14.55	14.66	15.62	15.37	15.93	15.99	14.32	8.69	
01671	Beauf	ST	6.44	6.59	12.57	13.68	6.57	11.27	9.98	11.18	12.77	14.86	15.33	14.39	18.22	15.47	14.55	14.66	15.62	15.37	15.93	15.99	14.32	8.69	
01672	Beauf	ST	6.44	6.59	12.57	13.68	6.57	11.27	9.98	11.18	12.77	14.86	15.33	14.39	18.22	15.47	14.55	14.66	15.62	15.37	15.93	15.99	14.32	8.69	
01673	Beauf	ST	6.44	6.59	12.57	13.68	6.57	11.27	9.98	11.18	12.77	14.86	15.33	14.39	18.22	15.47	14.55	14.66	15.62	15.37	15.93	15.99	14.32	8.69	
01674	Beauf	ST	6.44	6.59	12.57	13.68	6.57	11.27	9.98	11.18	12.77	14.86	15.33	14.39	18.22	15.47	14.55	14.66	15.62	15.37	15.93	15.99	14.32	8.69	
01675	Beauf	ST	6.44	6.59	12.57	13.68	6.57	11.27	9.98	11.18	12.77	14.86	15.33	14.39	18.22	15.47	14.55	14.66	15.62	15.37	15.93	15.99	14.32	8.69	
01676	Beauf	ST	6.44	6.59	12.57	13.68	6.57	11.27	9.98	11.18	12.77	14.86	15.33	14.39	18.22	15.47	14.55	14.66	15.62	15.37	15.93	15.99	14.32	8.69	
01677	Beauf	ST	6.44	6.59	12.57	13.68	6.57	11.27	9.98	11.18	12.77	14.86	15.33	14.39	18.22	15.47	14.55	14.66	15.62	15.37	15.93	15.99	14.32	8.69	
01678	Beauf	ST	6.44	6.59	12.57	13.68	6.57	11.27	9.98	11.18	12.77	14.86	15.33	14.39	18.22	15.47	14.55	14.66	15.62	15.37	15.93	15.99	14.32	8.69	
01679	Beauf	ST	6.44	6.59	12.57	13.68	6.57	11.27	9.98	11.18	12.77	14.86	15.33	14.39	18.22	15.47	14.55	14.66	15.62	15.37	15.93	15.99	14.32	8.69	
01680	Beauf	ST	6.44	6.59	12.57	13.68	6.57	11.27	9.98	11.18	12.77	14.86	15.33	14.39</											

du type de muscle (LT ou ST) et du type d'animal (bœuf ou taurillon) sur l'abondance des protéines.

La connaissance de ces effets muscle et type d'animal pourrait permettre de modifier l'expression de protéines considérées comme marqueurs de tendreté selon les contextes de production et ainsi d'apporter un savoir utile dans la maîtrise de la tendreté du vivant de l'animal afin d'adapter la conduite des animaux.

<u>Article Animal</u>

AUTHORS PROOF
NOT FOR DISTRIBUTION

Variations in the abundance of 24 protein biomarkers of beef tenderness according to muscle and animal type

N. Guillemin¹, C. Jurie¹, I. Cassar-Malek¹, J.-F. Hocquette¹, G. Renand² and B. Picard^{1†}

¹UR1213, Unité de Recherches sur les Herbivores, INRA, Centre de Clermont-Ferrand/Theix, Saint-Genès-Champanelle, France; ²UMR1313, Génétique Animale et Biologie Intégrative, INRA, Jouy-en-Josas, France

(Received 22 June 2010; Accepted 29 November 2010)

Some proteins have been revealed as biomarkers for beef tenderness by previous studies. These markers could be used in immunological tests to predict beef tenderness, in living animals as well as in carcasses. It is well known that rearing practices modify the amounts of mRNA and proteins. Therefore, the reliability of protein tests could be affected by livestock and biological effects such as production systems, breed, muscle and animal type. This study analysed the effects of animal and muscle type on 24 proteins. The animals studied were 67 young bulls and 44 steers of the Charolais breed, and muscles were Longissimus thoracis and Semitendinosus. Protein amounts were determined by Dot blot, an immunological technique. Results showed that expressions of 20 proteins were influenced by animal and/or muscle type. These results could lead to modifications and adaptations of prediction tests according to rearing practice, bovine breed and beef cut.

Keywords: beef, protein biomarker, meat tenderness, protein abundance, Dot blot

Implications

Protein biomarkers are tools to design tenderness prediction tests for the beef industry. This study showed that the expression of these markers is influenced by muscle and animal type, which are two factors important in beef production in France. Rearing systems are characterised by different production factors, capable of modifying the validity of tenderness prediction tests, notably by changes in protein expression profiles. The knowledge brought by this study is a first step in understanding these effects on protein biomarker expression. Finally, this type of knowledge could lead to improved management of beef tenderness during the animal's life.

Introduction

Beef is an important economic value in different countries such as the United States, Australia and France (Veyssset *et al.*, 2005). Consumers express an interest in high organoleptic meat quality, especially tenderness (Geay *et al.*, 2001). This quality is highly variable (Dransfield *et al.*, 2003; Picard *et al.*, 2007), which is a problem for the industry. The French beef industry is interested in meat tenderness tests

that are suitable for the majority of production systems used in France. These production systems differ notably by animal type (cows, heifers, steers, calves, young bulls) and the breed used (beef, hardy, dairy breeds). For a few years now, several research programmes have identified some potential biomarkers of beef tenderness, at the protein (Picard *et al.*, 2010), mRNA (Bernard *et al.*, 2007) and DNA (Hocquette *et al.*, 2007) levels, in different production systems.

Several studies have shown that the abundance of some gene transcripts and/or proteins can be affected by the production system, animal and muscle type (Hocquette *et al.*, 2007). The study by Cassar-Malek *et al.* (2009) showed that the production system (grass feeding of animals *v.* maize) lead to an oxidative switch in muscle metabolism. In the same way, different breeds exhibit differences in their muscle characteristics, as described in Jurie *et al.* (2007). Schreurs *et al.*'s (2008) study showed that the development of muscle characteristics differs between muscle types because of difference in testosterone levels in bulls and steers.

Therefore, the expression of some potential tenderness protein biomarkers can be influenced by factors such as animal and/or muscle type. The knowledge of these influences could be exploited to manage the abundance of different tenderness biomarkers in beef production in order to introduce management methods that would enhance the meat quality for the beef industry.

[†] E-mail: picard@clermont.inra.fr

Guillemin, Jurie, Cassar-Malek, Hocquette, Renand and Picard

Table 1 Potential tenderness markers identified by previous works

Potential marker	Gene	Previous works
Heat shock proteins		
αB-crystallin	<i>CRYAB</i>	Bernard <i>et al.</i> (2007), FC > 1.4
Hsp20	<i>HSPB6</i>	Jia <i>et al.</i> (2006), FC = −5.7
Hsp27	<i>HSPB1</i>	Bernard <i>et al.</i> (2007), FC > 1.4
Hsp40	<i>DNAJA1</i>	Bernard <i>et al.</i> (2007), FC > 1.4
Hsp70-1A	<i>HSPA1A</i>	Picard <i>et al.</i> (2010), FC = 0.84
Hsp70-8	<i>HSPA8</i>	Guillemin (2010), <i>r</i> = 0.27 and Guillemin <i>et al.</i> (2010), <i>P</i> < 0.05
Hsp70/GRP75	<i>HSPA9</i>	Guillemin (2010), <i>r</i> = 0.33 and Guillemin <i>et al.</i> (2010), <i>P</i> < 0.01
Metabolism		
Eno1	<i>ENO1</i>	Lametsch <i>et al.</i> (2003), <i>r</i> = 0.28
Eno3	<i>ENO3</i>	Lametsch <i>et al.</i> (2003), <i>r</i> = −0.32
LDHB	<i>LDHB</i>	Bouley (2004), FC = −2.1
MDH1	<i>MDH1</i>	Picard <i>et al.</i> (2010), FC = 0.8
PGM1	<i>PGM1</i>	Bouley (2004), FC = −2.0
Structure		
CapZ-β	<i>CAPZB</i>	Lametsch <i>et al.</i> (2003), <i>r</i> = 0.34
Desmin	<i>DES</i>	Picard <i>et al.</i> (2010), FC = 0.77
MLC-1F	<i>MLC1F</i>	Bouley (2004), FC = 2.0
MyBP-H	<i>MYBPH</i>	Bouley (2004), FC = 2.1
MyHC-I	<i>MYH7</i>	Bernard <i>et al.</i> (2007), FC > 1.4
MyHC-II	<i>MYH2</i>	Picard <i>et al.</i> (2010), FC = 0.32
MyHC-IIx	<i>MYH1</i>	Guillemin <i>et al.</i> (2010), tenderness <i>P</i> -value < 0.05
Oxidative resistance		
DJ-1	<i>PARK7</i>	Picard <i>et al.</i> (2010), FC = 0.72
PRDX6	<i>PRDX6</i>	Jia <i>et al.</i> (2009), tenderness <i>P</i> -value < 0.001
SOD1	<i>SOD1</i>	Picard <i>et al.</i> (2010), FC = 0.74
Proteolysis		
m-Calpain	<i>CAPN2</i>	Guillemin (2010), <i>r</i> = 0.28
μ-Calpain	<i>CAPN1</i>	Morris <i>et al.</i> (2006), tenderness genetic association <i>P</i> -value < 0.001

MyHC-I = myosins of heavy chains I; PRDX6 = peroxiredoxin 6; SOD1 = superoxide dismutase 1.

FC = protein fold change associated with tenderness according to cited literature; *r* = correlation coefficient associated with tenderness measurement according to cited literature.

The objective of this study was to analyse the effect of animal and muscle type on the expression of beef tenderness potential protein markers, previously identified in some genomic programmes as reported in Table 1. The proteins belong to five families according to their biological functions: heat shock proteins (HSPs), metabolism, structure, oxidative resistance and proteolysis.

Material and methods

Animals and samples

This study was conducted on 67 Charolais young bulls and 44 Charolais steers (castrated at 3 months of age) from the INRA programme MUGENE. The young bulls were slaughtered at 17 months of age on average and the steers at 30 months of age on average at the INRA experimental slaughterhouse in compliance with current ethical guidelines for animal welfare. Muscle samples from the *Longissimus thoracis* (LT; fast oxido-glycolytic with 25% of myosins of heavy chains I (MyHC-I), 62% of MyHC-IIa and 13% of MyHC-IIx in our experiment by electrophoresis (Picard *et al.*, 1999), and in accordance with Jurie *et al.* (1995, 2007) in

bovine) and *Semitendinosus* (ST; fast glycolytic with 11% of MyHC-I, 24% of MyHC-IIa and 66% of MyHC-IIx in our experiment, and in accordance with Schreurs *et al.* (2008) in bovine) muscles were excised for each animal within 15 min after slaughter. Muscle samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at −80°C until protein extraction. Approximately 100 mg of muscle samples were used for protein extraction.

Total protein extractions were performed according to Bouley *et al.* (2004) in a denaturation/extraction buffer (8.3 M urea, 2 M thiourea, 1% DTT, 2% CHAPS) and stored at −20°C until use. All chemical reagents were from Sigma (St. Louis, MO, USA). The protein concentration was determined by spectrophotometry with the Bradford assay (Bradford, 1976).

Immunological protein quantification

The conditions for use and specificity of primary antibodies against the 24 proteins analysed on bovine muscle were assessed by western blotting according to the methodology described by Guillemin *et al.* (2009a). Briefly, western blots were used in order to check the specificity of all the antibodies. An antibody was considered specific against the studied protein

Protein content according to muscle and animal types

when one band at the expected molecular weight was detected by western blot. BLAST analyses were done between the 24 studied bovine protein sequences against human protein databases, to assure that proteins share more than 90% of identity. An example of the human Hsp70-1A primary antibody validation is illustrated in Figure 1 and it shows that this human antibody binds to a bovine protein of the Hsp70-1A theoretical molecular weight. All the other

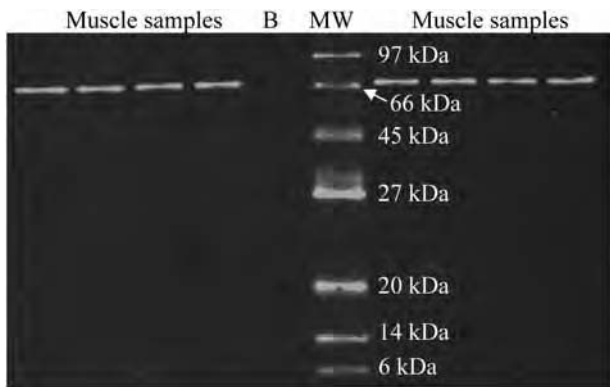


Figure 1 Primary antibody validation: Hsp70-1A (B = blank; MW = molecular weight, Hsp70-1A theoretical molecular weight = 70.22 kDa).

23 primary antibodies were tested for their specificity as described (data not shown). Optimal dilution ratios were determined in the same time, from suppliers' conditions and adapted to bovine muscle samples. Conditions used and suppliers for all primary antibodies are reported in Table 2.

Secondary fluorescent-conjugated IRDye 800CW antibodies (anti-mouse, anti-sheep, anti-rabbit) were supplied by LI-COR Biosciences (Lincoln, NE, USA) and used at 1/20 000.

Protein quantifications with the validated antibodies were done by Dot blot, as described by Guillemain *et al.* (2009a). Dot blot is a technique 15 times faster than western blot, characterised by the same technical variations (10%). This characteristic allowed us to analyse these 24 protein markers in less time than with western blot (6 months for Dot blot and 53 for western blot). Briefly, protein samples were spotted in quadruplicate on a nitrocellulose membrane with the Minifold I Dot blot from Schleicher & Schuell Biosciences (Germany) and hybridised with the specific antibody of each protein, with conditions defined by western blot. Then membranes were scanned by the scanner Odyssey (LI-COR Biosciences) at 800 nm. Protein abundance for each sample, given in arbitrary units, was normalised according to a mix of different samples, used as a reference.

Table 2 Suppliers and conditions for each primary antibody used in this study

Target protein	Antibody references	Dilution
Heat shock proteins		
αB-crystallin	Monoclonal anti-bovine Assay Designs SPA-222	1/500
Hsp20	Monoclonal anti-human Santa Cruz HSP20-11:sc51955	1/200
Hsp27	Monoclonal anti-human Santa Cruz HSP27 (F-4):sc13132	1/3000
Hsp40	Monoclonal anti-human Santa Cruz HSP40-4 (SPM251):sc-56400	1/250
Hsp70-1A	Monoclonal anti-human Abnova HSPA1B (M02), clone 3B7	1/2000
Hsp70-8	Monoclonal anti-bovine Santa Cruz HSC70 (BRM22):sc-59572	1/250
Hsp70/GRP75	Monoclonal anti-human RD Systems Clone 419612	1/250
Metabolism		
Eno1	Polyclonal anti-human Acris BP087	1/2000
Eno3	Monoclonal anti-human Abnova Eno3 (M01), clone 5D1	1/45 000
LDHB	Monoclonal anti-human Novus LDHB NB110-57160	1/50 000
MDH1	Monoclonal anti-pig Rockland 100-601-145	1/1000
PGM1	Monoclonal anti-human Abnova PGM1 (M01), clone 3B8-H4	1/8000
Structure		
CapZ-β	Monoclonal anti-human Abnova CAPZB (M03), clone 4H8	1/250
Desmin	Monoclonal anti-human DAKO clone D33, M0760	1/250
MLC-1F	Polyclonal anti-human Abnova MYL1 (A01)	1/1000
MyBP-H	Monoclonal anti-human Abnova MYBPH (M01), clone 1F11	1/4000
MyHC-I	Monoclonal anti-human Biocytex 5B9	1/2000
MyHC-II	Monoclonal anti-human Biocytex 15F4	1/4000
MyHC-IIx	Monoclonal anti-human Biocytex 8F4	1/500
Oxidative resistance		
DJ-1	Polyclonal anti-human Santa Cruz DJ-1 (FL-189):sc-32874	1/250
PRDX6	Monoclonal anti-human Abnova PRDX6 (M01), clone 3A10-2A11	1/500
SOD1	Polyclonal anti-rat Acris SOD1 APO3021PU-N	1/1000
Proteolysis		
m-Calpain	Monoclonal anti-bovine ABR m-calpain MA3-942	1/1000
μ-Calpain	Monoclonal anti-bovine Alexis μ-calpain 9A4H8D3	1/1000

MyHC-I = myosins of heavy chains I; PRDX6 = peroxiredoxin 6; SOD1 = superoxide dismutase 1.

Guillemin, Jurie, Cassar-Malek, Hocquette, Renand and Picard

Table 3 Effect of A and M type on potential protein biomarkers of tenderness

Protein	Protein mean value (arbitrary units)						<i>P</i> -value		
	A type			M type					
	Bulls	Steers	s.e. ^a	LT	ST	s.e.	A	M	A×M
Heat shock proteins									
αB-crystallin	17.4	13.0	0.58 (0.71)	20.4	10.0	0.56	0.0001	0.0001	0.41
Hsp20	16.6	12.0	0.30 (0.36)	17.6	11.0	0.26	0.0001	0.0001	0.0001
Hsp27	15.3	9.6	0.36 (0.44)	12.9	12.0	0.33	0.0001	0.08	0.05
Hsp40	14.8	14.1	0.25 (0.30)	15.8	13.1	0.24	0.09	0.0001	0.78
Hsp70-1A	13.4	13.5	0.32 (0.39)	16.1	10.8	0.35	0.95	0.0001	0.16
Hsp70-8	14.4	16.2	0.22 (0.27)	16.1	14.5	0.19	0.0001	0.0001	0.53
Hsp70/GRP75	14.0	16.1	0.21 (0.26)	15.3	14.8	0.24	0.0001	0.51	0.46
Metabolism									
Eno1	14.0	15.0	0.26 (0.31)	13.7	15.3	0.27	0.02	0.0001	0.56
Eno3	13.5	15.8	0.19 (0.23)	15.0	14.4	0.22	0.0001	0.07	0.39
LDH-B	15.3	14.6	0.37 (0.45)	15.1	14.7	0.33	0.3	0.47	0.22
MDH1	15.7	15.9	0.19 (0.23)	15.7	15.9	0.25	0.53	0.54	0.9
PGM	13.7	14.3	0.24 (0.29)	14.7	13.3	0.22	0.1	0.0001	0.11
Structure									
CapZ-β	15.0	15.9	0.20 (0.25)	15.3	15.6	0.21	0.003	0.43	0.03
Desmin	14.4	14.4	0.26 (0.32)	14.6	14.2	0.26	0.89	0.33	0.03
MLC-1F	13.2	15.5	0.26 (0.32)	14.2	14.5	0.23	0.0001	0.42	0.17
MyBP-H	15.9	13.8	0.54 (0.65)	16.4	13.3	0.34	0.01	0.0001	0.02
MyHC-I	15.2	15.7	0.26 (0.32)	16.4	14.4	0.26	0.2	0.0001	0.31
MyHC-II	15.3	15.1	0.17 (0.21)	14.6	15.8	0.20	0.37	0.0001	0.43
MyHC-IIx	14.2	17.6	0.75 (0.91)	9.9	21.9	0.63	0.005	0.0001	0.82
Oxidative resistance									
DJ-1	15.1	15.7	0.18 (0.22)	15.6	15.3	0.21	0.02	0.31	0.36
PRDX6	15.6	17.1	0.25 (0.30)	16.0	16.7	0.27	0.0002	0.05	0.06
SOD1	14.9	15.5	0.43 (0.52)	15.4	15.0	0.51	0.38	0.62	0.61
Proteolysis									
m-Calpain	13.3	15.3	0.22 (0.27)	14.4	14.2	0.23	0.0001	0.64	0.13
μ-Calpain	14.5	16.2	0.21 (0.26)	15.5	15.2	0.21	0.0001	0.31	0.42

A = animal; M = muscle; LT = *Longissimus thoracis*; ST = *Semitendinosus*; MyHC-I = myosins of heavy chains I; PRDX6 = peroxiredoxin 6; SOD1 = superoxide dismutase 1.

^as.e. for bulls; s.e. for steers are given in brackets.

Statistical analysis

Analysis of variance was performed using the GLM procedure of SAS version 9.1. The effects of animal type (bull v. steer), muscle (LT v. ST), animal-type × muscle-type interaction and animal tested within animal type were introduced into the model. The animal variation was used as the error term for the animal-type effect. When significant effects were detected, differences were evaluated by the PDIF option of SAS.

Results

There were effects of animal and/or muscle type on 20 of the 24 proteins studied (Table 3). Figure 2 illustrates the levels of the six proteins, which have significant interactions between animal- and muscle-type effects.

HSPs

Whereas abundance of αB-crystallin and Hsp27 was significantly higher in bulls than in steers ($P = 0.0001$),

amounts of Hsp70-8 and Hsp70/GRP75 were significantly higher in steers than bulls ($P = 0.0001$). Hsp40 and Hsp70-1A were not different between bulls and steers.

The LT muscle exhibited significantly higher abundance of αB-crystallin ($P < 0.001$), Hsp40 ($P < 0.001$), Hsp70-1A ($P < 0.001$) and Hsp70-8 ($P = 0.001$) than the ST muscle. Abundance of Hsp70/GRP75 was not different between muscles.

Significant animal-type × muscle-type interactions were observed for Hsp20 ($P < 0.001$) and Hsp27 ($P = 0.05$). Both Hsp were higher in bulls than in steers, and were higher in LT than in ST muscle with a greater difference between bulls and steers in LT muscle than in ST muscle for Hsp20, and only in steers for Hsp27 (Figure 2).

Proteins of energy metabolism

Abundance of Eno1 and Eno3 (glycolytic enzymes) was significantly higher in steers than in bulls ($P = 0.02$ and $P < 0.001$, respectively). The levels of three other proteins (LDH-B, PGM (glycolytic enzymes) and MDH1 (oxidative

Protein content according to muscle and animal types

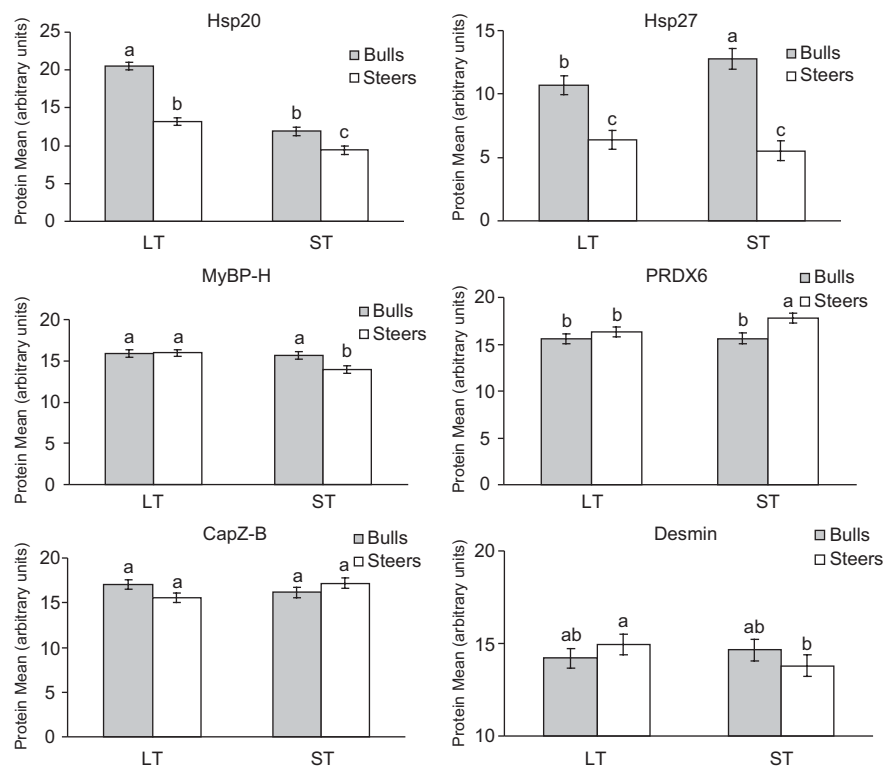


Figure 2 Means and significant differences of protein expression with animal- and muscle-type effect interactions. Protein expressions were quantified in arbitrary units.

enzyme)) were not significantly different between bulls and steers.

The ST muscle exhibited a significantly higher abundance of Eno1 ($P < 0.001$) than the LT muscle. Conversely, abundance of PGM was higher in LT than in ST muscle ($P < 0.001$). No significant muscle effect was detected for Eno3, LDH-B and MDH1.

Structural and contractile proteins

Abundance of MLC-1F and MyHC-IIx was significantly higher in steers than in bulls ($P < 0.001$ and $P = 0.005$, respectively). The bulls exhibited significantly higher abundance of MyBP-H ($P = 0.01$) than steers. There was no animal-type effect for Desmin, MyHC-I and MyHC-II.

Abundance of MyBP-H and MyHC-I was significantly higher in LT muscle than in ST muscle ($P < 0.001$ and $P < 0.001$, respectively). The interaction detected ($P = 0.02$) for MyBP-H amount did not change this difference. Whereas abundance of MyHC-I was higher in LT than in ST muscle, that of the MyHC-II (IIa + IIx) and MyHC-IIx was significantly higher in ST muscle than in LT ($P < 0.001$). No significant muscle effect was detected for CapZ- β , Desmin and MLC-1F.

Significant animal-type $\times$ muscle-type interactions were observed for CapZ-B, desmin and MyBP-H ($P < 0.05$; Table 2). Whereas no significant difference was observed between bulls and steers in LT muscle, in ST muscle, desmin and MyBP-H were more abundant in bulls than in steers and CapZ-B was more abundant in steers than in bulls.

Proteins of oxidative resistance

Abundance of DJ-1 and peroxiredoxin 6 (PRDX6) was significantly higher in steers than in bulls ($P = 0.02$ and $P < 0.001$, respectively). Concerning PRDX6, this difference was only observed in ST muscle (animal-type $\times$ muscle-type interaction effect, $P = 0.06$; Figure 2). No significant muscle effect was detected for these two proteins.

Abundance of superoxide dismutase 1 (SOD1) was not different between animal types and between muscle types.

Proteins involved in proteolysis

Whereas no significant differences were observed between muscles for m-calpain and μ -calpain, abundance in these two proteins was significantly higher in steers than in bulls ($P < 0.001$; Table 3).

Discussion

This study describes the effect of important factors in meat production (e.g. muscle and animal type) on the expression of some protein biomarkers of beef tenderness. The originality of this study is to provide new data about 24 proteins, for which there is very little information in the literature on bovine species. There are only data on their function and regulation, and for some of these mainly in humans. All the results described above are summarised in Table 4. We detected muscle-type effects on 14 of the 24 analysed proteins. This effect concerns mainly the Hsp family (excepted

Guillemin, Jurie, Cassar-Malek, Hocquette, Renand and Picard

Table 4 Summary of the A- and M-type effects detected or not for the 24 proteins

Protein	A type		M type	
	Bulls	Steers	LT	ST
Heat shock proteins				
αB-crystallin	+		+	
Hsp20	+		+	
Hsp27	+		+ (t, steers)	
Hsp40	+ (t)		+	
Hsp70-1A			+	
Hsp70-8		+	+	
Hsp70/GRP75		+		
Metabolism				
Eno1		+		+
Eno3		+	+ (t)	
LDH-B		No significant effect detected		
MDH1		No significant effect detected		
PGM			+	
Structure				
CapZ-β		+ (ST)		
Desmin		No significant effect detected		
MLC-1F		+		
MyBP-H	+		+	
MyHC-I			+	
MyHC-II				+
MyHC-IIx		+		+
Oxidative resistance				
DJ-1		+		
PRDX6		+ (ST)		+
SOD1		No significant effect detected		
Proteolysis				
m-Calpain		+		
μ-Calpain		+		

A = animal; M = muscle; LT = *Longissimus thoracis*; ST = *Semitendinosus*; MyHC-I = myosins of heavy chains I; PRDX6 = peroxiredoxin 6; SOD1 = superoxide dismutase 1.
An over-expression is indicated by a +.
The context specificity (A or M type) of the detected effect is indicated in brackets when necessary.
When the detected effect was not significant but showed a tendency, the letter *t* is added in brackets.

Hsp70/GRP75), the contractile proteins and some metabolic proteins. We identified an animal effect on 15 proteins of the 24 analysed. The animal effect assessed in this study was the difference between young bulls and steers. These two types of animals are characterised by some differences at the muscular, cellular and proteins levels (Cassar-Malek *et al.*, 2008), which likely explain the animal-type effects found in this study.

Protein of energy metabolism

It is well documented that the two muscles analysed in this study, the LT and the ST, have different characteristics in terms of muscle fibre composition (Totland and Kryvi, 1991). According to the literature data, the ST muscle may exhibit a lower oxidative activity (Jurie *et al.*, 2007) and a strong higher glycolytic activity notably a higher LDH activity compared to the LT (Jurie *et al.*, 1995). The LT muscle that contains a

higher proportion of slow fibres and higher oxidative metabolism than ST in young bulls is also characterised by a smaller fibre cross-sectional areas compared to the ST muscle (Schreurs *et al.*, 2008).

In this study, we observed a muscle-type effect for only two of the glycolytic enzymes quantified: PGM and Eno1. Eno1, the α-enolase, is a glycolytic enzyme that catalyses the conversion of 2-phospho-D-glycerate to phosphoenolpyruvate. This enolase is also involved in the immunoglobulin response and is a transcriptional regulator. Eno3, the β-enolase, is involved in the development and regeneration of muscle. In striated muscle, there are homodimers of β-enolase or heterodimers of α/β-enolase. Here, Eno1 was more abundant in ST muscle in accordance with the literature data. Moreover, it was more abundant in steers as Eno3. As muscles of steers are more glycolytic than bulls (Brandstetter *et al.*, 1998), this result is consistent with the literature data.

These two proteins, PGM and Eno1, were the only ones showing an animal-type effect among the metabolic proteins analysed in our study. PGM, which was more abundant in LT in our study, is involved in the first steps of glycolysis by catalysing the transformation of glucose-1-phosphate in glucose-6-phosphate. LDH-B, another glycolytic enzyme, catalyses the later steps of glycolysis with the pyruvate conversion to lactate. Their involvement at different stages of glycolysis could explain the differences in muscle-type effect observed. MDH1, an oxidative enzyme catalysing the transformation of malate to oxaloacetate, was no different between muscles.

In the literature, data obtained for metabolism were mainly provided by enzyme activity assays. They showed, for example, that the LDH activity was higher in steers than in bulls (Brandstetter *et al.*, 2002). In this study, we did not find any differences in LDH-B expression (glycolytic metabolism) between muscles, as for MDH1 (oxidative metabolism). This is in contradiction to the enzyme activity differences characterising the LT and ST muscles according to the literature. We can hypothesise that enzymes activity differences between muscles are mainly due to mechanisms of activation/inhibition rather than regulation of enzyme quantity. This would explain why there were no effects detected for LDH-B and MDH1 for either animal or muscle type.

Structural and contractile proteins

In accordance with the literature data, we observed a lower proportion of slow MyHC-I and higher proportions of fast (IIa and IIx) MyHCs in ST muscle. These MyHC isoforms are specific to the slow-twitch fibre type I, the fast-twitch oxidoglycolytic fibre IIa and the fast-twitch glycolytic fibre IIx, respectively (Lefaucheur, 2010). Myosins are hexameric proteins composed of two heavy chains (MyHC) and four light chains (MLC). The MLC-1F quantified in our study showed no differences between the two muscles. However, this isoform is associated with fast-twitch fibres IIa and IIx (Choi and Kim, 2009), which are very different between the two muscles. Myosins are motor proteins able to convert nutrients into energy for muscle contraction. MyHC isoforms have an ATPase activity, which defines the speed of fibre

contraction. They are therefore very important for determining the contractile type. MLC isoforms have a regulatory role in contraction and seem to be less sensitive to the muscle type. However, they showed a high animal-type effect with a higher proportion of MLC-1F in steers than in bulls. This was in accordance with the higher proportion of the fast MyHC-IIx as MLC-1F makes a fine adjustment to myosin motor activity and is expressed more in fast-twitch and glycolytic fibre (Choi and Kim, 2009). MyHC-IIx is the only MyHC different between the two types of animals in our study, but the effect was lower than that of muscle type. This result concurs with the literature data. For example, Brandstetter *et al.* (1998) showed that MyHC-IIx was over-expressed in steers more than in bulls. This study by Brandstetter *et al.* found that only the MyHC-IIx was over-expressed in steers, at the expense of MyHC-IIa, thereby showing a balance of these two MyHCs between steers and bulls. In our study, the antibody used against fast MyHC recognises MyHC-IIa and MyHC-IIx. As no animal effect was detected on MyHC-II, we can conclude that the total amount of MyHC-II is constant in steers and bulls. Hence, this balance of MyHC-II is dependent upon the regulation of animal type (e.g. age and sexual hormones) between amounts of MyHC-IIa and MyHC-IIx. Brandstetter *et al.*'s (1998) study also showed that the quantity of the MyHC-I was constant between steers and bulls, which is in accordance with the results of this study.

In our study, the MyBP-H showed a highly significant effect of muscle type with a higher proportion in LT muscle (more oxidative), which concurs with the animal-type effect observed with greater abundance in young bulls (more oxidative according to the literature). However, this is not consistent with the literature data on this protein. It is a protein of the thick myosin filament that binds to the myosins (Clark *et al.*, 2002), controlling the polymerisation and the assembly of the thick filament. This protein participates in the regulation of muscle contraction by inhibiting the myosin ATPase activity. It is considered to be associated with fast-twitch fibres (Lee *et al.*, 2007). However, its roles as yet are unknown. Gilbert *et al.* (1999) hypothesise that MyBP-H plays a role in the regulation of the synthesis of the thick filament, which could concur with our data.

The abundance of the two structural proteins, desmin and CapZ- β was no different between the two muscles. CapZ- β , a capping protein of the thin actin filament at the barbed and pointed ends, has a role in the organisation of the thin filament and its anchor to the Z-line (Clark *et al.*, 2002). The CapZ protein is a heterodimer of CapZ- α and CapZ- β . The proportion of CapZ- β was no different between the two muscles, so the abundance of the protein does not seem to be associated with the contractile and metabolic properties of muscles. However, it was significantly higher in the ST of steers illustrating a hormonal effect on its expression. The data in the literature show that the ST muscle shows strong anatomical differences between males, castrated males and females (Brandstetter *et al.*, 1998). This higher reactivity to androgens compared to LT could explain that differences in CapZ- β abundance were observed only in ST.

Desmin is a structural protein of the intermediate filament (Paulin and Li, 2004). This intermediate filament maintains the cytoarchitecture of muscle fibre and connects the contractile apparatus to the sarcolemma and the cytoskeleton (Herrmann *et al.*, 2007). In our study, desmin was one of the proteins showing no effect on muscle and animal types. The human desmin gene is regulated by a combination of different transcription factors. Some of these could regulate the quantity of desmin according the physiological characteristics of muscles. Our data suggest that in bovines, hormonal signals, metabolism and contractile activities do not influence this protein essential for cell integrity.

HSPs

The proteins of the HSP family quantified in our study showed very large differences between muscle type and animal type in accordance with the literature data showing high modifications of their expression under several physiological conditions (Kiang and Tsokos, 1998).

HSPs are mostly chaperones, essential for normal cell function, and also enable cells to resist stress (for review: Fink, 1999). They stabilise myofibrillar proteins under stress conditions and prevent them from losing function. This family is composed of several proteins, which can be classified into two main groups. The group of small HSP comprises 10 known members, among them the proteins Hsp20, Hsp27 and α B-crystallin, quantified in our study. These three proteins are present in great abundance in muscle tissue. According to Vicart *et al.* (1998), their high expression level would allow them to exert an intermediate protective effect in response to stress conditions with no lag time necessary for protein synthesis. They constitute a dynamic complex (Sun and MacRae, 2005). This complex is implicated in the control of phosphorylation of myosin light chains, control of translation via the factor eIF4G, regulation of the apoptotic pathway by sequestration of Bcl-X and Bax, protection against aggregation of actin, desmin, titin and myosin and finally protection against heat shock of the citrate synthase and the malate dehydrogenase enzymes of the oxidative metabolism. Therefore, this complex plays an important role in the cell, which is greatly influenced by such environmental factors as cell signals or stresses.

In our study, the three small HSPs showed a large effect of muscle and animal type, with an interaction between the two effects for Hsp20 and 27. These three HSPs were more abundant in LT than in ST and in young bulls compared to steers. These results are consistent with the study of Golenhofen *et al.* (2004) in rats, showing a higher abundance of HSPs in *soleus* (slow oxidative) compared to *extensor digitorum longus* (fast glycolytic) muscle. In cattle, LT contains a lower proportion of fast glycolytic fibres and higher proportion of oxidative fibres (I and IIa) compared with ST (Jurie *et al.*, 2007). Moreover, steers are characterised by a lower proportion of oxidative fibres and a higher proportion of fast glycolytic fibres (Brandstetter *et al.*, 1998). There are very few data in the literature on differences in HSP expression according to the muscle type. Our results in

Guillemin, Jurie, Cassar-Malek, Hocquette, Renand and Picard

cattle with those of Golenhofen *et al.* (2004) in rats, show that HSPs form a complex stress–response system in skeletal muscle with some common and some distinct functions between different muscle types. Golenhofen *et al.* (2004), using immunostaining, showed a higher intensity with an anti- α B-crystallin antibody in type I fibres compared to II fibres. Moreover, they observed some fast fibres displaying no staining and others with a strong staining, suggesting a differential expression between IIa and IIx/IIb fibres. We could suppose that in cattle the same differential expression is observed, given that the HSP family has a much conserved expression. Further analysis will be conducted on our samples by immunohistochemistry with the anti-HSP antibodies used in this study in order to validate this hypothesis. We can suppose that the LT muscle, which is more oxidative, needs protection against oxidative stress and the consequences of reactive oxygen species (ROS) formation in the cell.

The other group of HSP is made up of the HSP 70 family: Hsp70-1A, Hsp70-8 and Hsp70-GRP75. They function in the anti-apoptotic pathway, in the inhibition of ROS formation as well as a chaperone activity (Laufen *et al.*, 1999). Moreover, Hsp70-GRP75 controls cell proliferation and is used by the cell in case of glucose starvation to avoid ROS formation and cell aging (Kaul *et al.*, 2007). The two other HSPs (namely Hsp70-1A and Hsp70-8) bring chaperone activity with Hsp40 to ensure a good functioning of the muscle under constitutive oxidative stress conditions. In our study, we showed a high muscle-type effect on these HSP, except for Hsp70/GRP75. On the contrary, this HSP presents as high an animal-type effect as for Hsp70-8. For Hsp40, our results concerning muscle-type effect are in accordance with those of Cassar-Malek *et al.* (2010) showing a higher expression in oxidative muscles of cattle as we observed in LT compared to ST muscle. The animal-type effect observed for Hsp70-8 and GRP75 is the result of physiological factors combining the age of the animal and the testosterone effect (Voss *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2007). These authors demonstrated that oestrogen was positively correlated with the level of Hsp70-8 and Hsp70-GRP75. Levels of expression of the latter protein is also positively correlated with levels of thyroid hormones (Kaul *et al.*, 2007), which are known to be less abundant in young bulls than in steers. This is in accordance with the results of our study, which show that the muscles of steers have a greater abundance of Hsp70-GRP75 and also of Hsp70-8.

Finally, our results allow us to conclude that, despite their common function, for example anti-apoptotic activity and protection against cellular stresses, HSPs seem to be used specifically according to animal and muscle type. This is evident for the small HSP family complex, which protects the enzymes of the oxidative metabolism. This function is necessary in an oxidative metabolism context, which can explain why these proteins were more expressed in young bulls than in steers. Higher level of Hsp70 proteins in steers than bulls could reflect a more global role in chaperone activity on cell proteins, as the small HSP family complex is under-expressed in a less androgenic context than in steers.

Protein involved in oxidative resistance

The two proteins, DJ-1 and PRDX6, act against oxidative stress: DJ-1 as a quencher for ROS (Junn *et al.*, 2005) and PRDX6 as a catalyser of the H_2O_2 reduction (Wang *et al.*, 2003). ROS-driven oxidative stress influences many biological processes, including cell survival and death. Higher levels of ROS generated during muscle metabolic activities induce numerous physiological reactions and can cause significant damage. Accordingly, cells have evolved antioxidant defence systems including antioxidant enzymes such as SOD and PRDX. These last constitute a new family of antioxidants functioning in concert to detoxify ROS while playing an important role in cellular signalling by limiting ROS levels. Kubo *et al.* (2010), using *Prdx6* knockout mice, have described the ability of PRDX6 to abolish ROS-driven oxidative stress.

In our study, the most variable protein according to muscle or animal type was PRDX6, with an interaction between the two factors. Its abundance was higher in steers' muscles. We can hypothesise that the higher proportions of fast glycolytic fibres in steers require an active mechanism to counter the effects of oxidative stress, due to the lower quantity of HSPs. Therefore, PRDX6 and DJ-1 are important for steers in the case of oxidative stress. The specific difference for PRDX6, expressed more in ST muscle in steers, shows that this protein typically acts on glycolytic fibres. This could be a specific requirement of the ST glycolytic muscle in steers, which needs an active mechanism against ROS, like H_2O_2 reduction by PRDX6.

SOD1 is an enzyme that dismutates the superoxide anion, and is therefore involved in antioxidant defences (Moradas-Ferreira *et al.*, 1996). We observed no effect of both animal and muscle type in our study. We can therefore hypothesise that there is no difference in terms of ROS production between steers and bulls, or between LT and ST, under our experimental conditions.

Proteolytic proteins

The two proteins, m- and μ -calpain, from the calcium-dependent proteolytic system, were no different between the two muscles, but showed very large differences between animal types. They were more abundant in steers than in young bulls. These two enzymes are mainly responsible for protein degradation in muscle. Our results are in accordance with previous studies showing the influence of animal type on muscle proteolysis. For example, cortisol concentrations, higher in steers, increases the proteolysis rate (Fritsche and Steinhart, 1998). Moreover, testosterone concentrations, lower in steers, decreases this proteolysis rate (Lee *et al.*, 2007). We hypothesise that in our conditions, animal-type effects were mainly the result of sex hormone action, but other hormones conditioning muscle properties of animals came into play.

Conclusion

This study provides some original insight into the effect of muscle and animal type on the abundance of 24 proteins considered as biomarkers of beef tenderness. It showed that

Protein content according to muscle and animal types

animal and muscle types are characterised mainly by a differential expression of heat shock proteins and oxidative resistance proteins, depending on the glycolytic/oxidative potential of fibres, and contractile muscle type. The small HSP family is expressed in the more oxidative LT muscle, to protect proteins against ROS. It also uses Hsp70-1A and Hsp70-8 to refold proteins. In young bulls, the Hsp20 complex is also used, but with no other Hsp70-enhanced activity. This property is used by steers, where the abundance of Hsp20 complex is low. Steers use the protein DJ-1 to actively protect their cells. The glycolytic ST muscle has none of the oxidative protection system. We hypothesise that in case of cell stress, a strong and active pathway is engaged in the ST muscle to protect cells against ROS, by the way of SOD1 and PRDX6.

One of the aims of beef tenderness research is to bring new practices to manage tenderness in living animals. This aim requires knowledge of meat quality markers, notably the factors that optimise their expression. The results obtained by this study could bring new rearing practices for managing beef tenderness. These original data could be used in order to choose the best rearing conditions for a strong expression of tenderness biomarkers. This study, done on 222 different samples and on 24 proteins, provides the first knowledge of bovine biomarker expression according to rearing practices in order to manage beef tenderness in the future (Guillemin *et al.*, 2009b).

Acknowledgements

The PhD grant of N. Guillemin is provided by INRA and the regional council of Auvergne in France. This study was funded by the National Agency of Research and APIS-GENE for the MUGENE programme (through the AGENAE/GENANIMAL call). The authors thank Christiane Barboiron for her skilled technical assistance, David Chadeyron for determining enzymatic activities, the INRA experimental farms of Bourges for animal breeding and the experimental slaughterhouse of our Unit for animal slaughtering and muscle sampling.

References

Bernard C, Cassar-Malek I, LeCunff M, Dubroeuq H, Renand G and Hocquette JF 2007. New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 5229–5237.

Bouley J 2004. Analyse protéomique du muscle squelettique bovin. PhD thesis, Université de Clermont-Ferrand 2, Clermont-Ferrand, France.

Bouley J, Chambon C and Picard B 2004. Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 4, 1811–1824.

Bradford MM 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.

Brandstetter AM, Picard B and Geay Y 1998. Muscle fibre characteristics in four muscles of growing male cattle II. Effect of castration and feeding level. *Livestock Production Science* 53, 25–36.

Brandstetter AM, Sauerwein H, Veerkamp JH, Geay Y and Hocquette JF 2002. Effects of muscle type, castration, age and growth rate on H-FABP expression in bovine skeletal muscle. *Livestock Production Science* 75, 199–208.

Cassar-Malek I, Picard B, Bernard C and Hocquette JF 2008. Application of gene expression studies in livestock production systems: a European perspective. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 48, 701–710.

Cassar-Malek I, Jurie C, Bernard C, Barnola I, Micol D and Hocquette JF 2009. Pasture-feeding of Charolais steers influences skeletal muscle metabolism and gene expression. *Journal of Physiology and Pharmacology* 60, 83–90.

Cassar-Malek I, Guillemin N, Hocquette JF, Micol D, Bauchart D and Picard B 2010. Expression of DNAJA1 in bovine muscles according to developmental age and management factors. *Animal* (in press).

Choi YM and Kim BC 2009. Muscle fiber characteristics, myofibrillar protein isoforms, and meat quality. *Livestock Science* 122, 105–118.

Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC and Gregorio CC 2002. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 18, 637–706.

Dransfield E, Martin JF, Bauchart D, Abouelkaram S, Lepetit J, Culioli J, Jurie C and Picard B 2003. Meat quality and composition of three muscles from French cull cows and young bulls. *Animal Science* 76, 387–399.

Fink AL 1999. Chaperone-mediated protein folding. *Physiological Reviews* 79, 425–449.

Fritsche S and Steinhart H 1998. Differences in natural steroid hormone patterns of beef from bulls and steers. *Journal of Animal Science* 76, 1621–1625.

Geay Y, Bauchart D, Hocquette JF and Culioli J 2001. Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. *Reproduction Nutrition Development* 41, 1–26 (Erratum 41, 377).

Gilbert R, Cohen JA, Pardo S, Basu A and Fischman DA 1999. Identification of the A-band localization domain of myosin binding proteins C and H (MyBP-C, MyBP-H) in skeletal muscle. *Journal of Cell Science* 112, 69–79.

Golenhofen N, Perng MD, Quinlan RA and Drenkhahn D 2004. Comparison of the small heat shock proteins alpha B-crystallin, MKBP, HSP25, HSP20, and vHSP in heart and skeletal muscle. *Histochemistry and Cell Biology* 122, 415–425.

Guillemin N 2010. Marqueurs protéiques de la tendreté de la viande bovine: étude prédictive et fonctionnelle. Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France.

Guillemin N, Meunier B, Jurie C, Cassar-Malek I, Hocquette JF, Levézil H and Picard B 2009a. Validation of a Dot-blot quantitative technique for large-scale analysis of beef tenderness biomarkers. *Journal of Physiology and Pharmacology* 60, 91–97.

Guillemin N, Cassar-Malek I, Hocquette JF, Jurie C, Micol D, Listrat A, Levézil H, Renand G and Picard B 2009b. La maîtrise de la tendreté de la viande bovine: identification de marqueurs biologiques. *INRA Productions Animales* 22, 331–344.

Guillemin N, Jurie C, Renand G, Hocquette JF, Micol D, Lepetit J, Levézil H and Picard B 2010. Tenderness phenotypic and proteomic markers. *Journal of Animal Science* (in press).

Herrmann H, Bar H, Kreplak L, Strelkov SV and Aebi U 2007. Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 562–573.

Hocquette JF, Lehnert SA, Barendse W, Cassar-Malek I and Picard B 2007. Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. *Animal* 1, 159–173.

Jia X, Hollung K, Therkildsen M, Hildrum KI and Bendixen E 2006. Proteome analysis of early post-mortem changes in two bovine muscle types: *M. longissimus dorsi* and *M. semitendinosus*. *Proteomics* 6, 936–944.

Jia X, Veiseth-Kent E, Grove H, Kuziora P, Aass L, Hildrum KI and Hollung K 2009. Peroxiredoxin-6 – a potential protein marker for meat tenderness in bovine *M. Longissimus thoracis* muscle. *Journal of Animal Science* 87, 2391–2399.

Junn E, Taniguchi H, Jeong BS, Zhao X, Ichijo H and Mouradian MM 2005. Interaction of DJ-1 with Daxx inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 activity and cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 9691–9696.

Jurie C, Robelin J, Picard B, Renand G and Geay Y 1995. Inter-animal variation in the biological characteristics of muscle tissue in male Limousin cattle. *Meat Science* 39, 415–425.

Jurie C, Picard B, Hocquette JF, Dransfield E, Micol D and Listrat A 2007. Muscle and meat quality characteristics of Holstein and Salers cull cows. *Meat Science* 77, 459–466.

Kaul SC, Deocaris CC and Wadhwa R 2007. Three faces of mortalin: a housekeeper, guardian and killer. *Experimental Gerontology* 42, 263–274.

Kiang JG and Tsokos GC 1998. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacology & Therapeutics* 80, 183–201.

Guillemin, Jurie, Cassar-Malek, Hocquette, Renand and Picard

- Kubo E, Hasanova N, Tanaka Y, Fatma N, Takamura Y, Singh DP and Akagi Y 2010. Protein expression profiling of lens epithelial cells from Prdx6-depleted mice and their vulnerability to UV radiation exposure. *American Journal of Physiology – Cell Physiology* 298, C342–C354.
- Lametsch R, Karlsson A, Rosenvold K, Andersen HJ, Roepstorff P and Bendixen E 2003. Postmortem proteome changes of porcine muscle related to tenderness. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 6992–6997.
- Laufen T, Mayer MP, Beisel C, Klostermeier D, Mogk A, Reinstein J and Bukau B 1999. Mechanism of regulation of Hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 5452–5457.
- Lee CE, McArdle A and Griffiths RD 2007. The role of hormones, cytokines and heat shock proteins during age-related muscle loss. *Clinical Nutrition* 26, 524–534.
- Lefaucheur L 2010. A second look into fibre typing – relation to meat quality. *Meat Science* 84, 257–270.
- Moradas-Ferreira P, Costa V, Piper P and Mager W 1996. The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Molecular Microbiology* 19, 651–658.
- Morris CA, Cullen NG, Hickey SM, Dobbie PM, Veenvliet BA, Manley TR, Pitchford WS, Kruk ZA, Bottema CD and Wilson T 2006. Genotypic effects of calpain 1 and calpastatin on the tenderness of cooked M. longissimus dorsi steaks from Jersey × Limousin, Angus and Hereford-cross cattle. *Animal Genetics* 37, 411–414.
- Paulin D and Li ZL 2004. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Experimental Cell Research* 301, 1–7.
- Picard B, Barboiron C, Duris MP, Gagniere H, Jurie C and Geay Y 1999. Electrophoretic separation of bovine muscle myosin heavy chain isoforms. *Meat Science* 53, 1–7.
- Picard B, Berri C, Lefaucheur L, Molette C, Sayd T and Terlouw C 2010. Skeletal muscle proteomics in livestock production. *Briefings in Functional Genomics* 9, 259–278.
- Picard B, Jurie C, Bauchart D, Dransfield E, Ouali A, Martin JF, Jailler R, Lepetit J and Culioli J 2007. Caractéristiques des muscles et de la viande des principales races bovines allaitantes du Massif Central. *Sciences des Aliments* 27, 168–180.
- Schreurs NM, Garcia F, Jurie C, Agabriel J, Micol D, Bauchart D, Listrat A and Picard B 2008. Meta-analysis of the effect of animal maturity on muscle characteristics in different muscles, breeds, and sexes of cattle. *Journal of Animal Science* 86, 2872–2887.
- Sun Y and MacRae TH 2005. Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62, 2460–2476.
- Totland GK and Kryvi H 1991. Distribution patterns of muscle fibre types in major muscles of the bull (*Bos taurus*). *Anatomy and Embryology* 184, 441–450.
- Veyssset P, Bebin D and Lherm M 2005. Adaptation to Agenda 2000 (CAP reform) and optimisation of the farming system of French suckler cattle farms in the Charolais area: a model-based study. *Agricultural Systems* 83, 179–202.
- Vicart P, Caron A, Guicheney P, Li ZL, Prevost MC, Faure A, Chateau D, Chapon F, Tome F, Dupret JM, Paulin D and Fardeau M 1998. A missense mutation in the alpha B-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nature Genetics* 20, 92–95.
- Voss MR, Stallone JN, Li M, Cornelussen RNM, Knuefermann P and Knowlton AA 2003. Gender differences in the expression of heat shock proteins: the effect of estrogen. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology* 285, H687–H692.
- Wang X, Phelan SA, Forsman-Semb K, Taylor EF, Petros C, Brown A, Lerner CP and Paigen B 2003. Mice with targeted mutation of peroxiredoxin 6 develop normally but are susceptible to oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 278, 25179–25190.

Ce travail a permis de révéler des effets muscle et type d'animal sur l'abondance de 20 protéines, marqueurs potentiels de tendreté. Quatre protéines (Lactate DesHydrogenase B, Malate Deshydrogenase, Desmine et Super Oxyde Dismutase) ne présentent aucun effet du type de muscle et d'animal. La connaissance de ces effets permettra ainsi de déterminer l'impact de certains facteurs de production sur l'abondance de protéines d'intérêt. La connaissance du rôle et de l'importance de ces protéines dans la mise en place de la tendreté permettra de proposer des conduites d'élevage favorisant cette qualité sensorielle.

IV Relations entre abondance des protéines et la tendreté

Afin d'exploiter au maximum les données de cette thèse, nous avons choisi 4 approches complémentaires pour analyser les relations entre les 24 protéines analysées et la tendreté de la viande.

La première approche a consisté à analyser les coefficients de corrélation de chacune des 24 protéines avec soit la note de tendreté sensorielle (TG), soit la mesure mécanique Warner-Bratzler (WB). Ces analyses ont porté sur l'ensemble des différents contextes définis précédemment.

La deuxième approche dite « descriptive » a consisté à classer les échantillons en 3 classes, selon leur note TG d'une part, et mesure WB d'autre part, et à mettre en évidence les protéines permettant une discrimination entre des classes extrêmes de tendreté.

Les deux autres approches dites « prédictives » ont consisté à établir des équations de prédiction de la tendreté. Deux méthodes ont été employées :

- En considérant l'ensemble des 24 protéines analysés : c'est « l'approche prédictive globale ».
- En sélectionnant les protéines les plus explicatives : c'est « l'approche prédictive ciblée ».

IV.1 Analyse par corrélations

Cette approche a étudié les coefficients de corrélation de chaque protéine avec la tendreté estimée par la mesure de Warner-Bratzler (WB) ou la note de Tendreté sensorielle (TG) dans les différents contextes suivants (Tableau 17) : le LT de bœufs (note TG et mesure WB), le LT de taurillons (note TG et mesure WB), le LT des bœufs et taurillons groupés (note TG et

Protéine	LT Bœufs (N = 44)		LT Taurillons (N = 67)		LT (N = 111)		ST Bœufs (N = 44)		ST Taurillons (N = 67)		ST (N = 111)		LT + ST (N = 222)		Protéine
	WB	TG	WB	TG	WB	TG	WB		WB		WB		WB		
Heat Shock Proteins															
αB-crystalline															Heat Shock Proteins
Hsp20													-0,13 (t)		αB-crystalline
Hsp27													-0,2 (***)		Hsp20
Hsp40															Hsp27
Hsp70-1A															Hsp40
Hsp70-8													+0,15 (*)		Hsp70-1A
Hsp70-GRP75													+0,17 (*)		Hsp70-8
Métabolisme															Métabolisme
Eno1															Eno1
Eno3													+0,19 (***)		Eno3
LDHB															LDHB
MDH1															MDH1
PGM1															PGM1
Structure															Structure
CapZ-β															CapZ-β
Desmine															Desmine
MLC-1F															MLC-1F
MyBP-H															MyBP-H
MyHC-I															MyHC-I
MyHC-II															MyHC-II
MyHC-IIx															MyHC-IIx
Stress oxydant															Stress oxydant
DJ-1															DJ-1
PRDX6															PRDX6
SOD1															SOD1
Protéolyse															Protéolyse
M-calpaïne															M-calpaïne
μ-calpaïne															μ-calpaïne

Tableau 17. Corrélations entre chacune des 24 protéines étudiées et la mesure Warner-Bratzler et / ou note de Tendreté sensorielle dans différents contextes

(t) : 0,1 < P ≤ 0,05 ; (*) 0,05 < P ≤ 0,01 ; (**) 0,01 < P ≤ 0,001 ; (***) P < 0,001

mesure WB), le ST de bœufs (mesure WB), le ST de taurillons (mesure WB), le ST des bœufs et taurillons groupés (mesure WB), et enfin sur toutes les données des muscles LT et ST groupées (mesure WB).

IV.1.1 Muscle LT

Dans le LT de bœufs, la μ -calpaïne est corrélée significativement à la mesure WB (positive) et à la note TG en sens inverse (négative). C'est également le cas pour LDHB et MyBP-H, avec seulement une tendance.

Dans le LT de taurillons, seule CapZ- β et MyBP-H sont corrélées significativement à la note TG pour la première (positive pour CapZ- β), et à la mesure WB pour la seconde (positive pour MyBP-H). Cependant, il existe une tendance négative entre l'abondance de CapZ- β et la mesure WB, opposée à la corrélation avec la note TG.

En cumulant les deux types d'animaux, ces 4 protéines ne sont plus corrélées significativement, CapZ- β ne présente plus qu'une tendance avec la note TG et la mesure WB en sens inverse. En revanche le regroupement des bœufs et taurillons fait apparaître des corrélations significatives entre l'abondance de Hsp20 et de Eno1 avec la mesure WB, négative pour Hsp20 et positive pour Enolase1. De même, l'abondance de Hsp27 est corrélée négativement à la note TG. Une tendance négative entre l'abondance de PRDX6 et la note TG apparaît également.

De manière plus générale, très peu de protéines sont liées significativement à la tendreté dans le muscle LT, que ce soit avec la mesure WB ou la note TG. Aucune corrélation entre protéine et tendreté n'est commune aux bœufs et taurillons, à l'exception de MyBP-H. Mais l'abondance de cette protéine est négativement liée à la mesure WB chez les bœufs et positivement chez les taurillons, ce qui explique sa disparition lorsque les bœufs et taurillons sont groupés. Il existe donc un fort effet animal sur le rôle de cette protéine sur la tendreté.

IV.1.2 Muscle ST

Dans le ST de bœufs, PRDX6 et SOD1, enzymes anti-oxydantes, sont significativement corrélées à la mesure WB (négative). Dans le ST de taurillons, seule MyBP-H est corrélée avec la mesure WB (positive). Cette dernière présente une tendance en sens inverse chez les bœufs. Lorsque les deux types d'animaux sont cumulés, beaucoup de protéines sont significativement corrélées à la mesure WB. Ainsi, les HSP20s (Hsp27, Hsp20 et α B-crystalline) sont liées négativement à la mesure WB. Deux protéines de la famille HSP70

(Hsp70-8 et Hsp70-GRP75) sont corrélées positivement à la mesure WB, donc inversement aux HSP20s. C'est également le cas pour les deux émolases (Eno1, avec une tendance, et Eno3), CapZ- β et MLC-1F, DJ-1 (avec une tendance) et PRDX6, et les calpaïnes (M- et μ -calpaïnes). Un résultat surprenant est le fait que SOD1, très significativement corrélée à la mesure WB dans le ST de bœufs ($P < 0,001$), ne l'est plus du tout en cumulant les deux types d'animaux. Cette protéine est très impliquée dans la tendreté du ST de bœufs, mais ne l'est plus du tout dans le ST de taurillons. L'analyse conjointe des deux types d'animaux empêche la détection de cette protéine comme marqueur, trop spécifique des bœufs.

Le regroupement des bœufs et taurillons a permis de mettre en évidence un nombre plus élevé de corrélations significatives entre mesure WB et abondance de protéines.

IV.1.3 Muscles LT et ST cumulés

Lorsque les deux muscles sont considérés ensembles, les corrélations significatives établies précédemment dans le muscle ST seul sont retrouvées. Cependant, les valeurs des corrélations dans le contexte LT et ST cumulés sont systématiquement inférieures aux valeurs trouvées dans le contexte ST pris seul. Ainsi, le coefficient de corrélation de Hsp27 passe de -0,36 dans le ST pris seul, à -0,2 lorsque les muscles LT et ST sont cumulés. De plus, des protéines présentant un coefficient de corrélation significatif avec la mesure WB dans le muscle ST pris seul, ne sont plus retrouvées dans cette analyse. C'est par exemple le cas pour Hsp20 malgré le coefficient de corrélation de -0,28 ($P < 0,001$) avec la mesure WB dans le ST, qui n'est pas ressortie dans l'analyse muscles cumulés. A fortiori, les protéines Enolase1 et DJ-1, qui ne présentaient qu'une tendance avec la mesure WB du ST pris seul, ne sont pas ressorties par cette analyse muscle cumulée. Aucun des deux marqueurs du muscle LT pris seul, Hsp20 et Enolase1, n'est ressorti dans l'analyse muscle cumulé. Leurs coefficients de corrélation avec la mesure WB du LT pris seul étant opposés aux coefficients de corrélation avec la mesure WB du ST pris seul, il est tout à fait logique que l'analyse muscles cumulés trouve des coefficients nuls entre ces deux protéines et la mesure WB.

Ces résultats concernent surtout le muscle ST. En effet, très peu de protéines sont significativement liées à la tendreté dans le muscle LT. En terme de marqueurs, cette analyse a montré que l'abondance des HSPs est corrélée à la mesure WB du muscle ST. Le groupe des HSPS20s présente ainsi une corrélation négative avec la mesure WB, au contraire des HSP70s, présentant une corrélation positive. Cette inversion entre HSP20s

et HSP70s est très intéressante et mérite d'être étudiée attentivement au cours des autres approches de ce travail. Cette analyse a également montré une corrélation positive entre la mesure WB et les abondances des protéines du stress oxydant (DJ-1 et PRDX6), des enzymes glycolytiques (Enolases 1 et 3), et de manière plus surprenantes, les calpaïnes.

Cette analyse a permis de voir que SOD1 est un marqueur très spécifique du ST de bœufs, la corrélation très forte entre cette protéine et la mesure WB (0,43) n'étant retrouvée dans aucun autre contexte. De même, la relation entre mesure WB et abondance de MyBP-H dépend du type d'animal (-0,28 chez les bœufs, +0,25 chez les taurillons). Le regroupement des deux types d'animaux se fait au détriment de la détection de corrélations pour ces protéines.

Cette analyse montre que la cumulation des données des deux muscles apporte un biais. En effet, en raison des forts effets muscles, la relation entre protéines et tendreté diverge. L'analyse conjointe des deux muscles annule toute détection statistique de protéines comme marqueurs. Cette analyse cumulée est donc à proscrire. Au sein d'un muscle, il faut cumuler les deux types d'animaux pour détecter plus de marqueurs. L'exemple est flagrant dans le ST, malgré le contre-exemple de la SOD1. Ainsi, le nombre d'échantillons étant augmenté, la puissance statistique est meilleure et donc la détection de marqueurs significatifs est améliorée.

Par la suite dans les autres approches, les analyses porteront sur chaque muscle LT et ST pris séparément, mais en cumulant bœufs et taurillons, afin de valider des protéines comme marqueurs communs aux deux types d'animaux.

IV.2 Analyse descriptive

Cette approche a consisté à définir trois classes de tendreté (Inférieure, Moyenne et Supérieure) sur la base des mesures WB et des notes TG. Ainsi par analyse statistique, trois classes ont été constituées pour chacun des trois contextes analysés : mesures de WB pour les muscles ST et LT, et notes TG pour le LT. Cette approche a fait l'objet d'un article soumis à la revue *Journal of Animal Sciences*, en ce qui concerne les analyses de mesures WB des muscles ST et du LT.

Article Journal of Animal Sciences

TITLE PAGE

Tenderness phenotypic and proteomic markers

Different phenotypic and proteomic markers explain variability of beef tenderness across muscles¹

N. Guillemin^{*2}, C. Jurie^{*}, G. Renand[#], J-F. Hocquette^{*}, D. Micol^{*}, J. Lepetit[†], H. Levéziel[§], B. Picard^{*},

^{*}INRA, UR1213, Unité de Recherches sur les Herbivores, Centre de Clermont-Ferrand/Theix, Saint-Genès-Champanelle, F-63122 France.

[#]INRA, UMR1313, Génétique Animale et Biologie Intégrative, Jouy-en-Josas, F-78350 France.

[§]INRA, UMR1061, Unité de Génétique Moléculaire Animale, Faculté des Sciences et Techniques, F-87000 Limoges, France.

[†]INRA, UR0370, Unité Qualité des Produits Animaux, Centre de Clermont-Ferrand/Theix, Saint-Genès-Champanelle, F-63122 France.

¹ The PhD grant for N. Guillemin is provided by INRA and the regional council of Auvergne in France. This work was funded by the National Agency of Research (ANR) and APIS-GENE for the MUGENE programme (through the AGENAE/GENAIMAL call coordinated by J-F. Hocquette). The authors wish to thank Christian Barboiron for her technical assistance for protein extraction from samples, David Chadeyron for determining phenotypic data, and the INRA experimental farms of Bourges and Le Pin aux Haras for animal breeding and the INRA experimental slaughterhouse of Clermont-Ferrand / Theix for animal slaughtering and muscle sampling.

² Corresponding author: nicolas.guillemin@clermont.inra.fr

ABSTRACT

This study analyzed the abundance of 24 different proteins considered to be biomarkers of tenderness and 11 phenotypic characteristics of carcass composition and muscle properties. This was done on 111 samples of two muscles, *Longissimus thoracis* (LT) and *Semitendinosus* (ST) from the Charolais bovine breed. The strategy was to constitute three classes of tenderness (inferior, medium, superior) on the two muscles separately by using statistical analysis on the shear-force data (Warner-Bratzler). Then we tested which proteins or phenotypic characteristics explained this classification. Results showed that tenderness classes of ST muscle were well-explained by 12 proteins and 6 phenotypic characteristics. However, for LT muscle no protein could explain clearly the classification in three groups of tenderness. The classification could only be explained by 7 phenotypic characteristics: carcass composition, lipid content, collagen properties and fiber mean cross-section area. This demonstrates that in ST and LT the variability of beef tenderness is explained by different factors. In ST muscle, the main results of this study demonstrated the importance of Heat Shock Proteins such as Hsp27 ($P = 0.002$), Hsp70-GRP75 ($P=0.006$) and the oxidative stress protein: PRDX6 ($P = 0.003$) in the explanation of tenderness variability. We also confirmed the role of Enolase 3 involved in glycolytic metabolism ($P = 0.003$), of contractile protein such as MyHC IIx ($P = 0.028$) or MLC-1F ($P = 0.006$) and of the proteolic enzymes, calpains, in the determination of tenderness.

Key words: beef, muscle, markers, phenotypic, proteomic, tenderness classes

INTRODUCTION

Tenderness is an important criterion in consumer's meat appreciation, and so a determining factor in buying (Geay et al. 2001). Beef represents an important economic sector in some countries such as the United States, Brazil, Australia and France (Data from French Agriculture Ministry and Food and United Nations Agriculture Organization). However uncontrolled variability in tenderness is the number one reason for consumer dissatisfaction. This tenderness variability is due to the nature of muscle, which is a complex biological structure (Dransfield et al. 2003), consisting of fibers, adipocytes and connective tissue with different properties, each partially responsible for the variability in tenderness. For years functional genomics programs were developed to explain this variability in tenderness and to identify tenderness biomarkers, at DNA (Hocquette et al. 2007), RNA (Bernard et al. 2007) and protein levels (Picard et al. 2010). Some markers have been identified in different contexts of countries, breeds, muscles, etc, but these markers and their effects are not identical according to the contexts. Commercialized genetic tests, based on utilization of SNP (Single Nucleotide Polymorphism) markers of genes encoding μ -calpain and calpastatine, can predict the muscle tenderness class (Barendse 2002, Page et al. 2004). However, these tests are not efficient on French breeds (Van Eenennaam et al. 2007). So the French beef industry is looking for specific prediction tools for tenderness, based on biomarkers. The industry supports functional genomics programs to identify potential tenderness biomarkers.

The objective of this study was to confirm or not the predictive value of 24 proteins with respect to tenderness. These proteins were identified as biomarkers for beef tenderness by previous works (Bernard et al. 2007, Bouley et al. 2004, Morzel et al. 2008), and belong to different families: heat shock proteins, metabolism, structure, oxidative resistance and proteolysis.

MATERIALS AND METHODS

Animals and samples

This study took place over a period of two years with 67 Charolais young bulls and 44 Charolais steers (castrated at 3 months of age) from the French MUGENE program (Genanimal-APISGENE 2005-2009). The young bulls were slaughtered at 17 months of age on average and the steers at 30 months of age on average at the INRA experimental slaughterhouse in compliance with current INRA ethical guidelines for animal welfare. Muscle samples from the *Longissimus thoracis* (LT, 6th rib, fast oxido-glycolytic with 25 % of MyHC-I, 62 % of MyHC-IIA and 13 % of MyHC-IIX in our experiment by electrophoresis (Picard et al. 1999), and in accordance with Jurie et al. (2007, 1995) in bovine) and *Semitendinosus* (ST, middle of muscle, fast glycolytic with 11 % of MyHC-I, 24 % of MyHC-IIA and 66 % of MyHC-IIX in our experiment, and in accordance with Schreurs et al. (2008) in bovine) were excised within 15 minutes after slaughter. Muscle samples (N = 111 for each muscle) were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until protein extraction. Steaks for each muscle were matured at 4°C for 21 days, and then frozen at -20°C. After thawing, they were cooked to an internal temperature of 55°C. Shear-force measurements of each sample were carried out with a Warner-Braztler (WB) apparatus (Wheeler et al. 1997).

Immunological protein quantification

Total protein extractions were performed according to Bouley et al. (2004) in a denaturation/extraction buffer (8.3M urea, 2M thiourea, 1% DTT, 2% CHAPS). All chemical

reagents were from Sigma (St Louis, MO, USA). The protein concentration was determined by spectrophotometry with the Bradford assay (Bradford 1976). Protein extractions were stored at -20°C until use.

The conditions for use and specificity of primary antibodies against the 24 proteins analyzed in bovine muscle were assessed according to the methodology described by Guillemain et al. (2009). Briefly, western blots were used in order to check the specificity of all the antibodies.

An antibody was considered specific against the studied protein when one band at the expected molecular weight was detected by western blot (Duffy et al. 1999). BLAST analyses were done between the 24 studied bovine protein sequences against human protein databases, to assure that proteins share more than 90 % of identity. Western blots with the 24 primary antibodies show that all the antibodies bind specifically to a bovine protein with the theoretical molecular weight of the attempted protein (data not shown). Optimal dilution ratios were determined in the same time, from suppliers' conditions and adapted to bovine muscle samples. Conditions retained and suppliers for all primary antibodies are reported in Table 1.

Secondary fluorescent-conjugated IRDye 800CW antibodies (anti-mouse, anti-sheep, anti-rabbit) were supplied by LI-COR Biosciences (Lincoln, Nebraska, USA) and used at 1/20000.

Protein quantifications with the validated antibodies were carried out by Dot blot, with the protocol described by Guillemain et al. (2009). Dot blot is a technique 15 times faster than western blot, characterized by the same technical variations (10%). This characteristic

allowed us to analyze these 24 protein markers in less time than with western blot (6 months for Dot blot versus 53 for western blot). Briefly, protein samples **of each of the 222 muscle**

samples (111 for LT and 111 for ST) were spotted **(4 replications per muscle sample)** on a nitrocellulose membrane with the Minifold I Dot blot from Schleicher&Schuell Biosciences (Germany) and hybridized with the specific antibody of each protein, with conditions defined

by western blot. Then membranes were scanned by the Odyssey scanner (LI-COR Biosciences) at 800 nm. Protein abundance for each sample, given in arbitrary units, was normalized according to a mix of different samples, used as reference.

Phenotypic data

Phenotypic data used in this study was provided by the MUGENE program. The methods for analyzing carcass composition: carcass fat weight in kg (CFW) and percentage of muscle in the carcass (PMC) were described in Renand et al. (1995); enzyme activities in $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ (Cytochrome Oxidase (COX), Citrate Synthase (CS), Isocitrate Dehydrogenase (ICDH), Lactate Dehydrogenase LDH) were described in Jurie et al. (2007) and Piot et al. (1998). Methods used for measurements of total collagen content (Totcol), insoluble collagen (Inscol) in μg of OH-proline. mg^{-1} and its percentage of solubility (Solubility) in dry muscle, were described by Listrat and Hocquette (2004), and were described in Schreurs et al. (2008) for total lipids, triglycerides in $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ in fresh muscle, and fiber mean cross-section area in μm^2 . Data for fiber mean cross-section area were available only for LT muscle.

Statistical analysis

A disjoint cluster analysis was made using the XLSTAT (7.5.2) univariate partitioning procedure to produce three quality classes from shear-force measurement (Warner-Bratzler) of all samples. This cluster analysis was made per muscle, and from data adjusted for the year effect. Within each of the three classes determined for the LT and ST muscles respectively, the values of all proteins (Dot-Blot quantification) and phenotypic data, adjusted also for the

year effect, were analyzed by ANOVA and their significance between classes was determined by the comparison option.

RESULTS

Tenderness classes

Three tenderness classes were produced from the shear-force measurement, for LT and ST (Table 2): inferior tenderness (Inf), medium tenderness (Med), and superior tenderness (Sup). For LT muscle, Inf-class (N = 13) had an average of 58.2 N.kg⁻¹ (± 2.51). The Med-class (N = 64) had an average of 40.8 N.kg⁻¹ (± 0.46). The Sup-class (N = 34) had an average of 30.0 N.kg⁻¹ (± 0.61).

For ST muscle, Inf-class (N = 21) had an average of 82.7 N.kg⁻¹ (± 2.01). The Med-class (N = 36) had an average of 63.0 N.kg⁻¹ (± 0.72). The Sup-class (N = 54) had an average of 46.7 N.kg⁻¹ (± 0.76).

We can observe that for LT muscle the majority of samples (58%) were classified in the Med-class, whereas in ST they were classified in the Sup-class (49%). However, the shear-force values are higher in ST muscle for each class which agrees with the data in the literature generally indicating reduced tenderness of ST compared to LT muscle (Renand et al. 2001).

Differential abundance of proteins per class of tenderness in ST muscle

In ST muscle, 11 proteins significantly described tenderness classes (Table 3). Some proteins were more specific to Inf-class or Sup-class than others, and some described the Inf-class

comparatively to the Sup-class, but not the Med-class. No proteins discriminated the Med-class from the two others.

Abundances of Hsp27, Hsp70-8, MLC-1F, M-calpain, PRDX6 and MyHC IIx were significantly different ($P = 0.002$, $P = 0.037$, $P = 0.006$, $P = 0.015$, $P = 0.003$, $P = 0.028$ respectively) in Inf-class compared to the others. The toughest ST were characterized by higher abundance of Hsp70-8, MLC-1F, M-calpain, PRDX6, MyHC IIx and lower abundance of Hsp27.

Abundances of Hsp20 and Eno3 were significantly different ($P = 0.01$, $P = 0.003$ respectively) in Sup-class compared to the others. The ST Sup-class was characterized by lower abundance of Hsp20 and higher abundance of Enolase 3 involved in glycolytic metabolism.

Abundances of α B-crystallin, μ -calpain and Hsp70-GRP75 were significantly different ($P = 0.027$, $P = 0.006$ respectively) between Inf-class and Sup-class, but not with Med-class.

Differential abundance of proteins per class of tenderness in LT muscle

In LT muscle, only one protein significantly described tenderness classes (Table 4). The abundance of M-calpain was significantly different between the Inf-class and Med-class ($P = 0.042$), but not between these two classes and the Sup-class. There were no significant differences for the 23 other proteins. Only the abundance of PRDX6 had a tendency to discriminate the Med-class from the Sup-class ($P = 0.079$), but not between these two classes and Inf-class. In spite of a trend for μ -calpain ($P = 0.086$), this protein does not discriminate any class. Consequently none of the 24 quantified proteins explains the classification according to the shear-force measurement.

Differential phenotypic characteristics per class of tenderness in ST muscle

In ST muscle, 5 phenotypic characteristics significantly described tenderness classes (Table 5). Some characteristics discriminated Inf-class or Sup-class from the others, and some discriminated the Inf-class from the Sup-class, but not the Med-class. No proteins discriminated the Med-class from the two others as previously observed for protein abundances.

Only one phenotypic characteristic significantly discriminated the Inf-class from the two others: total lipids content ($P = 0.001$). The less tender ST muscle contained the highest lipid content (values for Inf-class, Med-class and Sup-class respectively: 22.6, 16.9, and 15.6 mg.g⁻¹ in fresh muscle). The carcass composition (CFW, PMC) and the collagen solubility significantly discriminated the Sup-class from the others ($P = 0.029$, $P = 0.014$, $P = 0.031$ respectively). The tenderest ST muscles were characterized by lower carcass adiposity and higher muscle mass and higher solubility of collagen.

Triglycerides were significantly different ($P = 0.022$) between Inf-class and Sup-class, but not between these two classes and Med-class.

There were no significant differences for the 6 other phenotypic characteristics. Only insoluble collagen tended to discriminate the Inf-class from the Sup-class ($P = 0.051$), but not between these two classes and Med-class.

Differential phenotypic characteristics per class of tenderness in LT muscle

In LT muscle, 6 phenotypic characteristics significantly described tenderness classes (Table 6). Some characteristics discriminated the Inf-class or Sup-class from the others. No characteristics discriminated the Med-class from the two others, as observed for ST muscle. CFW, collagen solubility, fiber mean cross-section area, triglycerides and lipids discriminated the Inf-class from others ($P = 0.031$, $P = 0.023$, $P = 0.019$, $P = 0.018$ and $P = 0.016$ respectively). The least tender LT muscles were characterized by lower adiposity of carcass, lower intra muscular fat content, lower solubility of collagen and higher mean cross-section areas. Inscor discriminated the Sup-class from the others ($P = 0.018$). There were no significant differences for the 6 other phenotypic characteristics. Only PMC tended to discriminate the Inf-class from the two others ($P = 0.075$).

DISCUSSION

Our results clearly demonstrate that the tenderness of LT and ST muscles is discriminated differentially. The quantified proteins considered as potential markers of tenderness did not allow a discrimination of LT tenderness. Among the 24 proteins studied only 11 explained tenderness classes in ST muscle. No protein in either muscle allowed discrimination with respect to the medium class of tenderness.

Discrimination of ST classes of tenderness

In the ST muscle, most of the proteins such as Hsp70-8, MCL-1F, M-calpain, PRDX6 and MyHC IIx were more expressed in the Inf-class, so they could be considered as markers of toughness. On the contrary Hsp27 discriminated the least tender ST by a lower abundance in coherence, with a higher abundance of Hsp20 and α B-crystallin observed in the tenderest ST.

These three HSP could be considered as tenderness markers as they allowed the identification of the tender group.

These three Heat Shock Proteins explaining tenderness classes in the same way belong to the same family called small HSPs or the HSP20 family (Sun and MacRae 2005). The expression of these proteins is highly correlated, as observed in human and mice (Golenhofen et al. 2004). They are particularly involved in the protection of structural proteins like desmin, titin, and actin (Bullard et al. 2004, Ghosh et al. 2007). The HSP20 proteins inhibit the formation of protein aggregates, to maintain protein accessibility (Melkani et al. 2006). So, HSP20 proteins could enhance proteolysis of structural proteins, especially during meat tenderization, and so meat tenderness.

Two others Heat Shock Proteins, Hsp70-8 and Hsp70/GRP75 belonging to the family of HSP70 appeared to be toughness markers in this study. These HSP70s are chaperone proteins. Unlike HSP20, their activity could inhibit meat tenderization by blocking protein-protein interactions of an important number of target proteins (Houry et al. 1999).

So HSP20s are tenderness markers, whereas HSP70s are toughness markers. We can hypothesize that tenderization efficiency is dependant on the HSP20s/HSP70s ratio. The HSP20s and HSP70s are also involved in oxidative resistance of the cell (Fink 1999, Laufen et al. 1999). Oxidative stress could be important in meat tenderization, by enhancing HSP expression and thus modifying the HSP20s / HSP70s ratio. The overall abundance of HSPs in the cell could influence meat tenderization, by another important cellular function of HSPs. HSP20s and HSP70s inhibit apoptosis by sequestering pro-apoptotic factors such as Bax (Beere and Green 2001, Concannon et al. 2003). Apoptosis have been identified as an enhancer of tenderization just after slaughtering by Ouali et al. (2006), notably by protein proteolysis done by caspases, enzymes able to degrade structural proteins (Chen et al. 2003, Nakanishi et al. 2001). So, this is in contradiction with the positive role of HSP20s with

tenderness. But the ST muscle is characterized by a less quantity of HSP20s and HSP70s contrary to LT muscle (Guillemin et al. 2010). So, in this ST muscle, there is a strong competition for Bax sequestration between HSP20s and HSP70s. We hypothesize that HSP20s mainly assure their function of chaperone against structural proteins aggregates, and HSP70s in Bax sequestration. This is the reason why in ST muscle, HSP20s are associated with tenderness, by protecting structural proteins and maintain proteolysis, contrary to HSP70s, associated with toughness, as these proteins inhibit apoptosis. In LT muscle, HSPs content is higher than in ST, and so these proteins are not related to tenderness classes.

Another marker related to toughness in our study was PRDX6. This enzyme, involved in redox reduction of the cell notably during oxidative stress, was validated as a tenderness marker in the LT muscle by the work of Jia et al. (2009). Our results showed a reverse role of PRDX6, *e.g.* as a toughness marker in ST muscle, not in LT. This result is surprising in the light of the work by Jia et al. (2009) on LT muscle. However it is well-known that there are muscle-type effects on protein implication in tenderness (Hocquette et al. 2007, Maltin et al. 2003). The role of PRDX6 on tenderness could depend on muscle type. This result confirms the implication of oxidative stress in tenderization suggested by HSPs.

So oxidative stress could be a pertinent cellular mechanism to explain tenderness classes. In fact this cellular mechanism could control *in fine* the functions of HSPs, notably to protect structural proteins against oxidative stress and proteolysis, essential for tenderness (Sentandreu et al. 2002).

The role of calpains (M- and μ -calpain) in proteolysis is well-known (Koohmaraie et al. 1991). So their implication in the discrimination of tenderness classes was not a surprise. However, we found that the protein M-calpain acts as a toughness marker since it was more abundant in the less tender ST, which is surprising. However, Picard et al. (2007) also observed that the levels of M-calpain and micro-calpain, measured only in the LT muscle,

were positively correlated with the maximum shear-forces (which correspond to the Inf-class) in meat from young bulls. This result must be interpreted carefully as here we measured only the abundance of protein and not its activity. Moreover, it was well-demonstrated that tenderness depends on the ratio between the activity of calpastatine (calpains inhibitor) and calpain (Kemp et al. 2010). In our study we have no information about calpastatine.

According to our data, we can hypothesize from the implication of HSPs and calpains that in ST muscle, tenderness is higher when protein proteolysis by calpains is low, protein proteolysis by caspases and aggregates formation inhibition by HSPs are high. However, this hypothesis must be validated.

Three structural and contractile proteins have been identified as toughness markers: MLC-1F, CapZ- β and MyHC IIX. These proteins are involved in the structure of fast-twitch fiber myofilaments (Clark et al. 2002). According to these results, we can hypothesize that proteins of fast-twitch fibers are toughness markers because they are more resistant to mechanical efforts during muscle contraction, and so are characterized by a resistance to proteolysis during meat tenderization.

As the fast-twitch fiber is associated with a glycolytic metabolism, it was not surprising to find lower abundance of Enolase 3, a glycolytic enzyme in the tenderest ST.

Among the 5 metabolic proteins quantified, only Enolase 3 could explain the tenderness classes. This demonstrated that metabolic properties of ST muscle are not the most discriminating parameters for tenderness.

Opposition between LT and ST tenderness discrimination

Previous studies have proved that LT and ST muscles exhibit different metabolic and contractile properties. ST muscle has a lower oxidative and a higher glycolytic activities than LT muscle (Jurie et al. 2007, Jurie et al. 1995). LT muscle has a higher amount of

slow-twitch myosins and fibre, and ST has a higher amount of fast-twitch myosins and fibre (Guillemin et al. 2010, Schreurs et al. 2008).

In our study the least tender LT muscles were characterized by lower carcass adiposity and intramuscular fat, less soluble collagen content and higher mean cross-section areas of fibers. These relationships between these characteristics and tenderness are coherent with the numerous data in the literature concerning this muscle (Crouse et al. 1991, Jurie et al. 2007, Picard et al. 2007, Renand et al. 2001). However for ST muscle the contrary was observed, except for collagen content, because the least tender ST was characterized by higher intramuscular fat. Picard et al (2007) also found a positive correlation between lipid content and measurement of shear-force in ST muscle from young bulls in coherence with our results. In accordance with this, in our study the tenderest ST had lower carcass adiposity and intramuscular fat, while on the contrary they had higher muscle mass. This relationship between muscle mass and tenderness is in coherence with the data obtained on double-muscled cattle (Allais et al. 2010). They have higher muscle mass and higher meat tenderness, particularly for ST muscle which is hypertrophied in double-muscled cattle (Bouley et al. 2005). The contradiction between ST and LT muscles has been already observed. For example, Picard et al (2007) demonstrated on muscles of young bulls and cows that in the LT, tenderness was correlated positively with the slow oxidative state while for the ST it was correlated positively with the glycolytic properties. Inverse relationships between protein markers and tenderness have been revealed also by proteomic analysis of these two muscles. For example in Blonde d'Aquitaine young bulls Hsp27 and α B-crystallin were less abundant in the most tender LT muscles, while on the contrary in the most tender ST from the same animal, these 2 proteins were less abundant (for review **Picard et al,(2010)**).

It is interesting to observe that adiposity of carcass and intramuscular lipid content explained tenderness in the same way. In LT both were less abundant in the least tender meat. On the

contrary, in ST they were both in lower abundance in the most tender meat. They could constitute good predictors of tenderness but in an opposite way for the two muscles.

Only the data concerning collagen solubility discriminated for tenderness in the same way for both ST and LT muscles. The insoluble collagen concentration was a toughness marker, whereas solubility was a tenderness marker. So, the less abundant the collagen and the more soluble it is, the more tender the meat. This type of result is in accordance with the numerous works on collagen and tenderness (McCormick 1999, Renand et al. 2001). It confirms that collagen defines a basal level of tenderness, with the same effect on tenderness in both ST and LT muscles.

In conclusion, this study clearly demonstrates that tenderness is not discriminated by the same parameters in LT and ST muscles. The proteins considered as phenotypic markers of tenderness according to previous genomic functional programs allowed a good discrimination of tenderness in ST but not in LT muscle. So genomics studies can improve and promote tenderness of poor quality meat. Only collagen properties discriminate the tenderness classes in the same way for both muscles.

LITERATURE CITED

- Allais, S., Leveziel, H., Payet-Duprat, N., Hocquette, J. F., Lepetit, J., Rousset, S., Denoyelle, C., Bernard-Capel, C., Journaux, L., Bonnot, A. and Renand, G., 2010. The two mutations, q204x and nt821, of the myostatin gene affect carcass and meat quality in young heterozygous bulls of french beef breeds. *Journal of Animal Science* 88 (2): 446-454.
- Barendse, W., 2002. DNA markers for meat tenderness. Patent WO02064820.
- Beere, H. M. and Green, D. R., 2001. Stress management - heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. *Trends in Cell Biology* 11 (1): 6-10.
- Bernard, C., Cassar-Malek, I., LeCunff, M., Dubroeuq, H., Renand, G. and Hocquette, J. F., 2007. New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. *J. Agric. Food Chem.* 55 (13): 5229-5237.

- 370 Bouley, J., Chambon, C. and Picard, B., 2004. Mapping of bovine skeletal muscle proteins
371 using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 4 (6):
372 1811-1824.
- 373 Bouley, J., Meunier, B., Chambon, C., De Smet, S., Hocquette, J. F. and Picard, B., 2005.
374 Proteomic analysis of bovine skeletal muscle hypertrophy. *Proteomics* 5 (2): 490-500.
- 375 Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
376 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72
377 248-254.
- 378 Bullard, B., Ferguson, C., Minajeva, A., Leake, M. C., Gautel, M., Labeit, D., Ding, L.,
379 Labeit, S., Horwitz, J., Leonard, K. R. and Linke, W. A., 2004. Association of the
380 chaperone {alpha}b-crystallin with titin in heart muscle. *J. Biol. Chem.* 279 (9): 7917-
381 7924.
- 382 Chen, F., Chang, R., Trivedi, M., Capetanaki, Y. and Cryns, V. L., 2003. Caspase proteolysis
383 of desmin produces a dominant-negative inhibitor of intermediate filaments and
384 promotes apoptosis. *J Biol Chem* 278 (9): 6848-6853.
- 385 Clark, K. A., McElhinny, A. S., Beckerle, M. C. and Gregorio, C. C., 2002. Striated muscle
386 cytoarchitecture: An intricate web of form and function. *Annual Review of Cell and*
387 *Developmental Biology* 18 637-706.
- 388 Concannon, C. G., Gorman, A. M. and Samalli, A., 2003. On the role of hsp27 in regulating
389 apoptosis. *Apoptosis* 8 (1): 61-70.
- 390 Crouse, J. D., Koohmaraie, M. and Seideman, S. D., 1991. The relationship of muscle fibre
391 size to tenderness of beef. *Meat Science* 30 (4): 295-302.
- 392 Dransfield, E., Martin, J. F., Bauchart, D., Abouelkaram, S., Lepetit, J., Culioli, J., Jurie, C.
393 and Picard, B., 2003. Meat quality and composition of three muscles from french cull
394 cows and young bulls. *Anim. Sci.* 76 387-399.
- 395 Duffy, L. K., Scofield, E., Rodgers, T., Patton, M. and Bowyer, R. T., 1999. Comparative
396 baseline levels of mercury, hsp 70 and hsp 60 in subsistence fish from the yukon-
397 kuskokwim delta region of alaska. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol*
398 *Endocrinol* 124 (2): 181-186.
- 399 Fink, A. L., 1999. Chaperone-mediated protein folding. *Physiol. Rev.* 79 (2): 425-449.
- 400 Geay, Y., Bauchart, D., Hocquette, J. F. and Culioli, J., 2001. Effect of nutritional factors on
401 biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants,
402 consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. *Reprod Nutr Dev* 41
403 (1): 1-26. Erratum, 41, 377.
- 404 Ghosh, J. G., Houck, S. A. and Clark, J. I., 2007. Interactive sequences in the stress protein
405 and molecular chaperone human [alpha]b crystallin recognize and modulate the
406 assembly of filaments. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39
407 (10): 1804-1815.
- 408 Golenhofen, N., Perng, M. D., Quinlan, R. A. and Drenckhahn, D., 2004. Comparison of the
409 small heat shock proteins alpha b-crystallin, mkbp, hsp25, hsp20, and cvhsp in heart
410 and skeletal muscle. *Histochemistry and Cell Biology* 122 (5): 415-425.
- 411 Guillemain, N., Jurie, C., Cassar-Malek, I., Hocquette, J. F., Renan, G. and Picard, B., 2010.
412 Variations in the abundance of 24 proteins biomarkers of beef tenderness according to
413 muscle and animal type. *Animal* In Press.
- 414 Guillemain, N., Meunier, B., Jurie, C., Cassar-Malek, I., Hocquette, J. F., Levéziel, H. and
415 Picard, B., 2009. Validation of a dot-blot quantitative technique for large-scale
416 analysis of beef tenderness biomarkers. *Journal of Physiology and Pharmacology* 60
417 (Suppl 3): 91-97.

- Hocquette, J. F., Lehnert, S. A., Barendse, W., Cassar-Malek, I. and Picard, B., 2007. Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. *Animal* 1 159-173.
- Houry, W. A., Frishman, D., Eckerskorn, C., Lottspeich, F. and Hartl, F. U., 1999. Identification of in vivo substrates of the chaperonin groel. *Nature* 402 (6758): 147-154.
- Jia, X., Veiseth-Kent, E., Grove, H., Kuziora, P., Aass, L., Hildrum, K. I. and Hollung, K., 2009. Peroxiredoxin-6 - a potential protein marker for meat tenderness in bovine m. Longissimus thoracis muscle. *J. Anim Sci.* 2391-2399.
- Jurie, C., Picard, B., Hocquette, J. F., Dransfield, E., Micol, D. and Listrat, A., 2007. Muscle and meat quality characteristics of holstein and salers cull cows. *Meat Science* 77 (4): 459-466.
- Jurie, C., Robelin, J., Picard, B., Renand, G. and Geay, Y., 1995. Inter-animal variation in the biological characteristics of muscle-tissue in male limousin cattle. *Meat Science* 39 (3): 415-425.
- Kemp, C. M., Sensky, P. L., Bardsley, R. G., Buttery, P. J. and Parr, T., 2010. Tenderness - an enzymatic view. *Meat Science* 84 (2): 248-256.
- Koohmaraie, M., Whipple, G., Kretchmar, D. H., Crouse, J. D. and Mersmann, H. J., 1991. Postmortem proteolysis in longissimus muscle from beef, lamb and pork carcasses. *J Anim Sci* 69 (2): 617-624.
- Laufen, T., Mayer, M. P., Beisel, C., Klostermeier, D., Mogk, A., Reinstein, J. and Bukau, B., 1999. Mechanism of regulation of hsp70 chaperones by dnaj cochaperones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (10): 5452-5457.
- Listrat, A. and Hocquette, J. F., 2004. Analytical limits of total and insoluble collagen content measurements and of type i and iii collagen analysis by electrophoresis in bovine muscles. *Meat Sci.* 68 (1): 127-136.
- Maltin, C., Balcerzak, D., Tilley, R. and Delday, M., 2003. Determinants of meat quality: Tenderness. *Proc Nutr Soc* 62 (2): 337-347.
- McCormick, R. J., 1999. Extracellular modifications to muscle collagen: Implications for meat quality. *Poult Sci* 78 (5): 785-791.
- Melkani, G. C., Cammarato, A. and Bernstein, S. I., 2006. [alpha]b-crystallin maintains skeletal muscle myosin enzymatic activity and prevents its aggregation under heat-shock stress. *Journal of Molecular Biology* 358 (3): 635-645.
- Morzel, M., Terlouw, C., Chambon, C., Micol, D. and Picard, B., 2008. Muscle proteome and meat eating qualities of longissimus thoracis of "Blonde d'aquitaine" Young bulls: A central role of hsp27 isoforms. *Meat Sci.* 78 (3): 297-304.
- Nakanishi, K., Maruyama, M., Shibata, T. and Morishima, N., 2001. Identification of a caspase-9 substrate and detection of its cleavage in programmed cell death during mouse development. *J Biol Chem* 276 (44): 41237-41244.
- Ouali, A., Herrera-Mendez, C. H., Coulis, G., Becila, S., Boudjellal, A., Aubry, L. and Sentandreu, M. A., 2006. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Science* 74 (1): 44-58.
- Page, B. T., Casas, E., Quaas, R. L., Thallman, R. M., Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., Koohmaraie, M., White, S. N., Bennett, G. L., Keele, J. W., Dikeman, M. E. and Smith, T. P. L., 2004. Association of markers in the bovine capn1 gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. *J. Anim Sci.* 82 (12): 3474-3481.

- Picard, B., Barboiron, C., Duris, M. P., Gagniere, H., Jurie, C. and Geay, Y., 1999. Electrophoretic separation of bovine muscle myosin heavy chain isoforms. *Meat Science* 53 (1): 1-7.
- Picard, B., Berri, C., Lefaucheur, L., Molette, C., Sayd, T. and Terlouw, C., 2010. Skeletal muscle proteomics in livestock production. *Briefings in Functional Genomics* 9 (3): 259-278.
- Picard, B., Jurie, C., Bauchart, D., Dransfield, E., Ouali, A., Martin, J. F., Jailler, R., Lepetit, J. and Culioli, J., 2007. Caractéristiques des muscles et de la viande des principales races bovines allaitantes du massif central. *Sciences des Aliments* 27/2 168-180.
- Piot, C., Veerkamp, J. H., Bauchart, D. and Hocquette, J. F., 1998. Contribution of mitochondria and peroxisomes to palmitate oxidation in rat and bovine tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 121 (2): 185-194.
- Renand, G., Jurie, C., Robelin, J., Picard, B., Geay, Y. and Menissier, F., 1995. Genetic-variability of muscle biological characteristics of young limousin bulls. *Genetics Selection Evolution* 27 (3): 287-298.
- Renand, G., Picard, B., Touraille, C., Berge, P. and Lepetit, J., 2001. Relationships between muscle characteristics and meat quality traits of young charolais bulls. *Meat Science* 59 (1): 49-60.
- Schreurs, N. M., Garcia, F., Jurie, C., Agabriel, J., Micol, D., Bauchart, D., Listrat, A. and Picard, B., 2008. Meta-analysis of the effect of animal maturity on muscle characteristics in different muscles, breeds, and sexes of cattle. *Journal of Animal Science* 86 (11): 2872-2887.
- Sentandreu, M. A., Coulis, G. and Ouali, A., 2002. Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends in Food Science & Technology* 13 (12): 400-421.
- Sun, Y. and MacRae, T. H., 2005. Small heat shock proteins: Molecular structure and chaperone function. *Cell Mol Life Sci* 62 (21): 2460-2476.
- Van Eenennaam, A. L., Li, J., Thallman, R. M., Quaas, R. L., Dikeman, M. E., Gill, C. A., Franke, D. E. and Thomas, M. G., 2007. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. *J. Anim Sci.* 85 (4): 891-900.
- Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., Johnson, L. P., Miller, M. F., Miller, R. K. and Koohmaraie, M., 1997. A comparison of warner-bratzler shear force assessment within and among institutions. *J Anim Sci* 75 (9): 2423-2432.

TABLES AND FIGURES

Table 1. Suppliers and conditions for each primary antibody used in this study

Target protein	Antibody references	Dilution
Heat Shock Proteins		
α B-crystallin	Monoclonal anti-bovine Assay Designs SPA-222	1/500
Hsp20	Monoclonal anti-human Santa Cruz HSP20-11:sc51955	1/200
Hsp27	Monoclonal anti-human Santa Cruz HSP27 (F-4):sc13132	1/3,000
Hsp40	Monoclonal anti-human Santa Cruz HSP40-4 (SPM251):sc-56400	1/250
Hsp70-1A	Monoclonal anti-human Abnova HSPA1B (M02), clone 3B7	1/2,000
Hsp70-8	Monoclonal anti-bovine Santa Cruz HSC70 (BRM22):sc-59572	1/250
Hsp70/GRP75	Monoclonal anti-human RD Systems Clone 419612	1/250
Metabolism		
Eno1	Polyclonal anti-human Acris BP087	1/2,000
Eno3	Monoclonal anti-human Abnova Eno3 (M01), clone 5D1	1/45,000
LDHB	Monoclonal anti-human Novus LDHB NB110-57160	1/50,000
MDH1	Monoclonal anti-pig Rockland 100-601-145	1/1,000
PGM1	Monoclonal anti-human Abnova PGM1 (M01), clone 3B8-H4	1/8,000
Structure		
CapZ- β	Monoclonal anti-human Abnova CAPZB (M03), clone 4H8	1/250
Desmin	Monoclonal anti-human DAKO clone D33, M0760	1/250
MLC-1F	Polyclonal anti-human Abnova MYL1 (A01)	1/1,000
MyBP-H	Monoclonal anti-human Abnova MYBPH (M01), clone 1F11	1/4,000
MyHC-I	Monoclonal anti-human Biocytex 5B9	1/2,000
MyHC-II	Monoclonal anti-human Biocytex 15F4	1/4,000
MyHC-IIx	Monoclonal anti-human Biocytex 8F4	1/500
Oxidative resistance		
DJ-1	Polyclonal anti-human Santa Cruz DJ-1 (FL-189):sc-32874	1/250
PRDX6	Monoclonal anti-human Abnova PRDX6 (M01), clone 3A10-2A11	1/500
SOD1	Polyclonal anti-rat Acris SOD1 APO3021PU-N	1/1,000
Proteolysis		
M-calpain	Monoclonal anti-bovine ABR M-calpain MA3-942	1/1,000
μ -calpain	Monoclonal anti-bovine Alexis μ -calpain 9A4H8D3	1/1,000

Hsp: Heat Shock Protein. Eno: Enolase. LDHB: Lactate DeHydrogenase-B. MDH1: Malate DeHydrogenase-1. PGM: PhosphoGlucoMutase-1. MLC: Myosin Light Chain. MyHC: Myosin Heavy Chain. PRDX: Peroxiredoxin. SOD: Super Oxide Dismutase.

Table 2. Warner-Bratzler (WB) mean values among the three tenderness classes for each of the two muscles: *Longissimus Thoracis* (LT) and *Semitendinosus* (ST)

	LT						ST					
	Inf (N = 13)		Med (N = 64)		Sup (N = 34)		Inf (N = 21)		Med (N = 36)		Sup (N = 54)	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
WB	58.2	2.5	40.8	0.5	30.0	0.6	82.6	2.0	63.0	0.7	46.6	0.8

512

Table 3. Protein means (arbitrary units) in the three tenderness classes for ST muscle

	Inf-class		Med-class		Sup-class		<i>P</i> -values
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	
Heat Shock Proteins							
α B-crystallin	8.0b	0.6	10.4ab	0.7	11.4a	0.8	0.027
Hsp20	10.5b	0.4	10.8b	0.4	12.1a	0.3	0.01
Hsp27	9.6b	0.6	13.0a	0.9	14.4a	0.7	0.002
Hsp40	12.9	0.6	12.9	0.5	13.4	0.4	0.69
Hsp70-1B	10.7	0.5	11.1	0.5	10.7	0.4	0.84
Hsp70-8	15.4a	0.5	14.0b	0.4	13.9b	0.3	0.037
Hsp70-GRP75	15.8a	0.4	14.7ab	0.4	13.8b	0.4	0.006
Metabolism							
Enolase 1	16.4	0.7	14.8	0.4	14.9	0.4	0.121
Enolase 3	15.5a	0.6	14.4a	0.4	13.4b	0.3	0.003
LDHB	15.1	0.7	13.6	0.7	15.2	0.5	0.12
MDH1	16.5	0.6	15.6	0.4	15.6	0.3	0.32
PGM	13.9	0.4	12.8	0.4	13.1	0.4	0.256
Structure							
CapZ- β	16.2a	0.5	14.8b	0.4	15.2ab	0.3	0.079
Desmin	14.3	0.6	14.0	0.4	14.5	0.3	0.597
MLC-1F	16.1a	0.7	14.0b	0.5	13.8b	0.3	0.006
MyBP-H	12.6	1.1	13.5	0.7	14.1	0.7	0.453
MyHC-I	14.3	0.6	14.7	0.5	14.1	0.5	0.695
MyHC-II	16.1	0.4	15.3	0.4	16.0	0.3	0.261
MyHC-IIx	26.0a	2.5	19.4b	1.2	21.4b	1.2	0.028
Oxidative resistance							
DJ-1	15.6	0.4	15.0	0.4	15.0	0.3	0.533
PRDX6	18.3a	0.7	16.4b	0.5	15.6b	0.4	0.003
SOD1	15.5	0.5	14.6	0.3	15.1	1.1	0.844
Proteolysis							
M-calpain	15.4a	0.6	13.9b	0.4	13.5b	0.4	0.015
μ -calpain	16.0a	0.5	15.1ab	0.4	14.4b	0.4	0.049

513

514

515

516

Hsp: Heat Shock Protein. LDHB: Lactate DeHydrogenase-B. MDH1: Malate DeHydrogenase-1. PGM: PhosphoGlucoMutase-1. MLC: Myosin Light Chain. MyHC: Myosin Heavy Chain. PRDX: Peroxiredoxin. SOD: Super Oxide Dismutase.

517

Table 4. Protein means (arbitrary units) in the three tenderness classes for LT muscle

	Inf-class		Med-class		Sup-class		P-values
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	
Heat Shock Proteins							
α B-crystallin	18.2	1.5	21.4	1.0	23.3	1.3	0.396
Hsp20	20.2	1.4	18.4	0.6	17.4	0.8	0.206
Hsp27	13.8	1.2	13.8	0.5	13.3	0.6	0.82
Hsp40	15.5	0.7	15.8	0.3	15.9	0.4	0.831
Hsp70-1B	16.7	1.0	15.8	0.5	15.8	0.7	0.767
Hsp70-8	15.3	0.7	15.9	0.3	15.9	0.4	0.718
Hsp70-GRP75	13.7	0.6	15.2	0.3	15.5	0.4	0.193
Metabolism							
Enolase 1	12.5	0.4	13.5	0.3	14.1	0.5	0.152
Enolase 3	13.8	0.5	15.0	0.3	14.5	0.3	0.191
LDHB	15.1	1.2	14.8	0.5	15.8	0.6	0.505
MDH1	15.1	0.7	15.6	0.3	15.7	0.4	0.699
PGM	14.5	0.7	14.5	0.3	14.8	0.4	0.806
Structure							
CapZ- β	14.4	0.5	15.0	0.3	15.7	0.4	0.128
Desmin	13.3	0.6	15.0	0.4	14.1	0.5	0.119
MLC-1F	13.3	0.8	14.3	0.4	14.1	0.3	0.503
MyBP-H	18.8	2.1	16.0	0.5	16.7	0.9	0.191
MyHC-I	16.0	0.5	16.3	0.3	16.3	0.4	0.906
MyHC-II	14.1	0.3	14.4	0.2	14.8	0.3	0.33
MyHC-IIx	7.8	0.7	9.6	0.7	10.6	1.2	0.359
Oxidative resistance							
DJ-1	14.8	0.4	15.5	0.3	15.7	0.3	0.355
PRDX6	15.3	0.6	16.3	0.3	15.1	0.4	0.079
SOD1	14.6	1.0	15.5	0.5	15.2	0.8	0.808
Proteolysis							
M-calpain	12.8b	0.7	14.6a	0.3	14.1ab	0.3	0.042
μ -calpain	14.5	0.6	15.6	0.3	14.9	0.3	0.086

518

519

520

521

Hsp: Heat Shock Protein. LDHB: Lactate DeHydrogenase-B. MDH1: Malate DeHydrogenase-1. PGM: PhosphoGlucoMutase-1. MLC: Myosin Light Chain. MyHC: Myosin Heavy Chain. PRDX: Peroxiredoxin. SOD: Super Oxide Dismutase.

Table 5. Phenotypic measurement means in the three tenderness classes for ST muscle

	Inf-class		Med-class		Sup-class		P-values
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	
COX ($\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)	12.5	1.2	11.4	0.6	10.7	0.6	0.264
CS ($\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)	5.9	0.4	5.6	0.3	5.3	0.2	0.362
CFW (kg)	66.6a	3.5	64.3a	2.1	58.8b	1.5	0.029
ICDH ($\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)	1.4	0.1	1.5	0.1	1.3	0.1	0.771
Inscol ($\mu\text{g of OH-proline.mg}^{-1}$)	4.1	0.1	4.0	0.1	3.7	0.1	0.051
LDH ($\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)	917.2	24.2	868.9	17.2	893.7	14.4	0.243
Lipids (mg.g^{-1})	22.6a	2.4	16.9b	1.0	15.6b	0.8	0.001
Mean area fiber (μm^2)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
PMC (%)	69.4b	0.7	69.9b	0.4	71.2a	0.4	0.014
Solubility (%)	20.1b	2.5	21.5b	2.0	27.9a	2.1	0.031
Totcol ($\mu\text{g of OH-proline.mg}^{-1}$)	5.2	0.2	5.2	0.1	5.2	0.1	0.962
Triglycerides (mg.g^{-1})	10.7a	1.8	8.0ab	0.9	6.6b	0.7	0.022

n.a: non available data

COX: Cytochrome Oxidase. CS: Citrate Synthase. CFW: Carcasse Fat Weight. ICDH: Isocitrate Dehydrogenase. Inscol: Insoluble Collagen. LDH: Lactate Dehydrogenase. PMC: Percentage of muscle in the carcass. Totcol: Total collagen content.

527 **Table 6.** Phenotypic measurement means in the three tenderness classes for LT muscle

	Inf-class		Med-class		Sup-class		P-values
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	
COX ($\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)	12.0	1.0	12.5	0.5	12.6	0.7	0.902
CS ($\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)	4.1	0.3	4.5	0.1	4.7	0.2	0.282
CFW (kg)	53.4b	3.7	63.6a	1.4	62.5a	2.5	0.031
ICDH ($\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)	1.3	0.1	1.3	0.0	1.3	0.1	0.777
Inscol (μg of OH-proline. mg^{-1})	2.9a	0.1	2.7a	0.1	2.5b	0.1	0.018
LDH ($\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)	991.0	48.3	982.8	14.7	969.2	19.4	0.822
Lipids (mg.g^{-1})	18.3b	1.3	27.7a	1.4	26.7a	1.8	0.016
Mean area fiber (μm^2)	3350.9a	152.7	2925.2b	63.6	2916.6b	82.6	0.019
PMC (%)	72.0	0.8	70.2	0.3	70.2	0.5	0.075
Solubility (%)	14.5b	1.8	24.3a	1.8	27.0a	2.4	0.023
Totcol (μg of OH-proline. mg^{-1})	3.4	0.2	3.7	0.1	3.5	0.1	0.284
Triglycerides (mg.g^{-1})	9.4b	1.4	18.9a	1.5	18.1a	1.9	0.018

528 COX: Cytochrome Oxidase. CS: Citrate Synthase. CFW: Carcasse Fat Weight. ICDH: Isocitrate
529 Dehydrogenase. Inscol: Insoluble Collagen. LDH: Lactate Dehydrogenase. PMC: Percentage of muscle in the
530 carcass. Totcol: Total collagen content.

Cette analyse a montré que les 24 protéines étudiées permettent de décrire les classes de tendreté uniquement dans le ST. Dans ce muscle, trois protéines se distinguent, ce sont Hsp27, Hsp20 et α B-crystalline. Contrairement aux autres, ces protéines sont plus abondantes dans la classe présentant une mesure WB faible, donc une tendreté élevée. Contrairement à ces protéines, Hsp70-8 et Hsp70-GRP75 sont plus abondantes dans la classe présentant une mesure WB forte, donc une tendreté faible. L'hypothèse posée dans ce travail est que le rapport entre protéines de la famille des Hsp20 et protéines de la famille des Hsp70 est important pour la tendreté dans le muscle ST.

La protéine PRDX6 est également une autre protéine plus abondante dans la classe présentant une mesure WB forte (tendreté faible). Cette enzyme étant impliquée dans la lutte contre le stress oxydant, cela confirme l'importance de ce mécanisme révélé par les HSPs. De manière étonnante, la μ -calpaïne et la M-calpaïne sont également plus abondantes dans la classe présentant une mesure WB forte, bien que ces protéines interviennent dans la protéolyse. Les autres protéines plus abondantes dans la classe avec la mesure de WB plus forte sont Enolase 3, MLC-1F, CapZ- β , et MyHC-IIx.

Ce travail a également montré que les classes de tendreté dans le muscle LT ne pouvaient être décrites à partir de ces 24 protéines. Cependant, les données phénotypiques ont permis de distinguer ces trois classes, tout comme pour le muscle ST. Ces données, à l'exception des données sur le collagène, présentent des profils inversés dans les deux muscles, en accord avec la bibliographie. Cela montre que les mécanismes biologiques expliquant la répartition des classes de tendreté du LT sont les mêmes que pour le ST. Cependant, les protéines intervenant dans ces mécanismes n'expliquent pas la répartition des classes de la même manière entre les deux muscles. Il serait donc pertinent d'analyser la relation entre d'autres protéines participant à ces mécanismes biologiques étudiés et la tendreté du muscle LT. Cette analyse a également montré que les activités enzymatiques ne permettent pas d'expliquer la répartition en classes de tendreté dans les deux muscles. De par leur absence dans la distinction des classes de tendreté et la complexité d'analyse, les activités enzymatiques ne paraissent pas être des marqueurs pertinents pour la tendreté.

Une analyse portant sur les classes de tendreté effectuées à partir des notes TG du muscle LT a également été effectuée. Les caractéristiques de ces classes sont indiquées dans le Tableau 18. Cette analyse n'a pas été publiée avec les deux autres. En effet, dans ce contexte, aucune protéine et aucune donnée phénotypique n'a permis de distinguer les classes. En ce qui concerne les protéines, ce résultat est en accord avec ce qui a été avancé pour le muscle

	Inférieure (N = 16)		Moyenne (N = 59)		Supérieure (N = 36)	
	Moyenne	SE	Moyenne	SE	Moyenne	SE
TG	3,4	0,08	4,6	0,04	5,7	0,06

Tableau 18. Caractéristiques des classes de tendreté globale du muscle LT

LT, à savoir une implication d'autres protéines dans la tendreté. Le faible écart entre les notes TG dans ce muscle par rapport au ST de chacune des classes pourrait expliquer pourquoi aucune caractéristique phénotypique n'est significativement explicative des classes.

Cette approche descriptive a permis de distinguer des protéines explicatives des classes de mesures de Warner-Bratzler dans le ST uniquement. Des caractéristiques phénotypiques sont explicatives des classes de mesures de Warner-Bratzler dans les deux muscles.

IV.3 Analyse prédictive globale

Cette approche a consisté à établir une équation de prédiction de la tendreté (mesures WB ou TG) pour chaque muscle, à partir de l'abondance de l'ensemble des 24 protéines quantifiées par une régression linéaire multiple, sans éliminer du calcul les protéines non significativement corrélées à la tendreté. De ce fait, chaque protéine apportait une contribution pour expliquer la variabilité de la tendreté, ce qui marque une différence avec les autres approches, dans lesquelles les protéines non significativement reliées à la tendreté sont écartées des équations.

IV.3.1 Equations de prédiction

Une première régression linéaire a été effectuée séparément sur l'ensemble des échantillons du muscle ST (mesure WB) et du muscle LT (mesure WB et note TG), ce qui a établi une équation de prédiction pour chaque muscle à partir de l'abondance des 24 protéines.

De cette façon, les mesures de tendreté prédites et mesurées présentent une valeur de r^2 de 0,37, 0,23 et 0,35 pour le ST-WB, le LT-WB et le LT-TG respectivement (Figures 39 à 41). Donné dans le même ordre, l'écart entre la valeur (WB ou TG) prédite et mesurée est en moyenne de 16,2 %, 16,5 % et 11,9 %, cet écart permettant d'estimer la marge d'erreur de l'équation de prédiction. Cela signifie que ces équations ne peuvent pas être utilisées de manière satisfaisante pour un test de prédiction de la tendreté et doivent être améliorées.

Cependant, un examen des différences entre valeur prédite et valeur mesurée pour chaque échantillon sur l'ensemble de la population montre que cette différence n'est pas homogène sur l'ensemble des échantillons et dépend de ces derniers, ce pour le muscle ST (mesure WB) et le muscle LT (mesure WB et note TG).

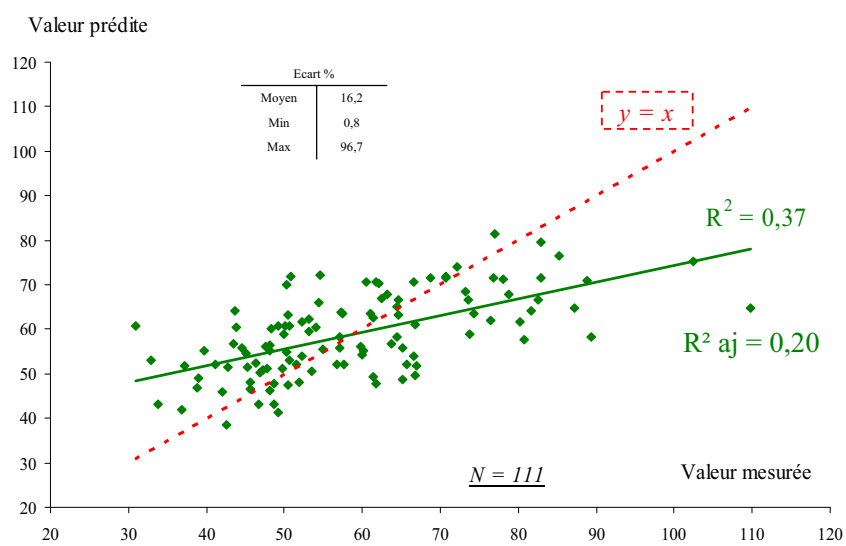


Figure 39. Différences entre les valeurs mesurée et prédites pour le ST-WB (Première équation)

Une droite d'équation $y = x$, résultant des différences nulles pour une équation parfaite, est représentée

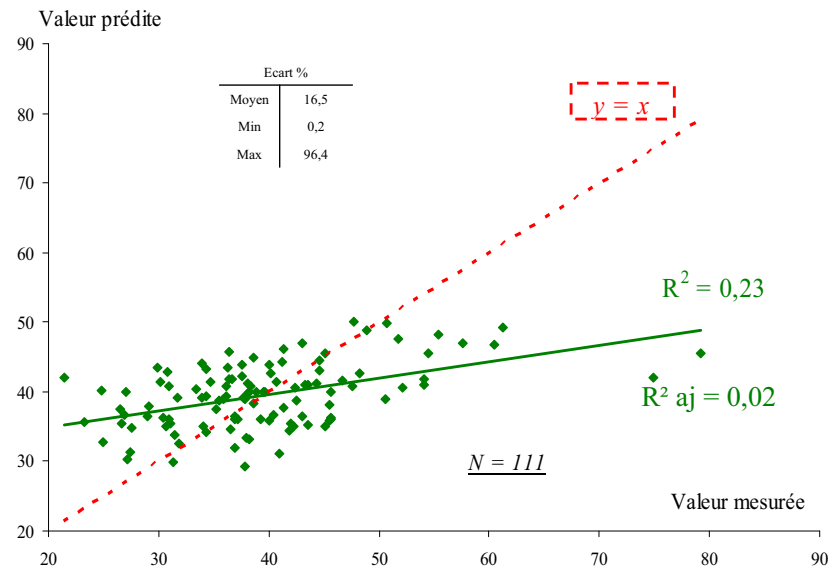


Figure 40. Différences entre les valeurs mesurée et prédites pour le LT-WB (Première équation)

Une droite d'équation $y = x$, résultant des différences nulles pour une équation parfaite, est représentée

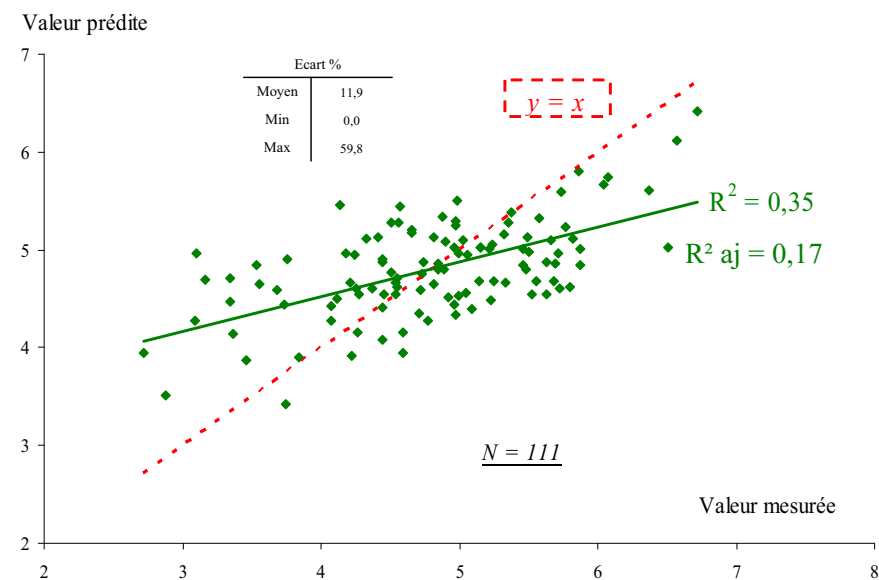


Figure 41. Différences entre les valeurs mesurée et prédites pour le LT-TG (Première équation)

Une droite d'équation $y = x$, résultant des différences nulles pour une équation parfaite, est représentée

Ainsi, sur les 111 échantillons de chaque muscle, 63 pour le ST-WB (soit 57 %), 62 pour le LT-WB (soit 56 %) et 82 pour le LT-TG (soit 74 %) présentent une marge d'erreur inférieure à 15 % de la valeur mesurée. Ceci montre qu'à partir de ces 24 protéines, nous sommes en mesure de prédire la mesure WB (pour le ST et LT) sur environ la moitié de la population, et la mesure de TG (seulement sur le LT) sur les trois quarts. Aussi, dans une seconde régression linéaire, nous avons considéré uniquement ces échantillons qualifiés de « prédictibles », opposés aux échantillons dits « imprédictibles », pour affiner la prédiction à partir de l'abondance des 24 protéines.

IV.3.2 Equation de prédiction de la mesure de Warner-Bratzler du muscle ST

Une seconde régression linéaire a été effectuée sur les 63 échantillons dits « prédictibles » du muscle ST (soit 57 % de l'ensemble des échantillons) entre la mesure WB et les abondances des 24 protéines. L'équation établie par la régression a permis de calculer pour les 63 échantillons une valeur de mesure WB prédite présentant une corrélation de 0,93 ($r^2 = 0,86$) avec les valeurs mesurées (Figure 42). Cette équation permet donc de calculer une valeur de mesure WB avec une marge d'erreur de 5,9 %.

En terme de marqueurs, sur le muscle ST, la première régression sur l'ensemble des échantillons ($N = 111$) montre que PRDX6 (Peroxyredoxine 6) et LDHB (Lactate Dehydrogenase B) sont les variables les plus explicatives de la mesure WB (Tableau 19A). Ces deux protéines sont retrouvées dans la seconde régression sur le groupe d'échantillons « prédictibles » ($N = 63$), ce qui montre leur robustesse dans la prédiction (Tableau 19B). Cette deuxième régression montre en outre que 4 autres protéines sont importantes, Hsp70-1B, Hsp70-GRP75, Hsp40 et MyHC (Myosin Heavy Chain) IIX. L'abondance des protéines PRDX6, Hsp70-1B, Hsp70-GRP75 et MyHC-IIX intervient positivement sur la mesure WB. Au contraire, l'abondance des protéines LDHB et Hsp40 intervient négativement sur la mesure WB. Les abondances des protéines μ -calpaïne et α B-crystalline d'une part, et de Enolase1 d'autre part, interviennent respectivement de manière négative et positive avec la mesure WB, mais seulement avec une tendance.

IV.3.3 Equation de prédiction de la mesure de Warner-Bratzler du muscle LT

Une seconde régression linéaire a été effectuée sur les 62 échantillons dits « prédictibles » du muscle LT (soit 56 % de l'ensemble des échantillons) entre la mesure WB et les abondances des 24 protéines. L'équation établie par la régression a permis de calculer pour les

Valeur prédite

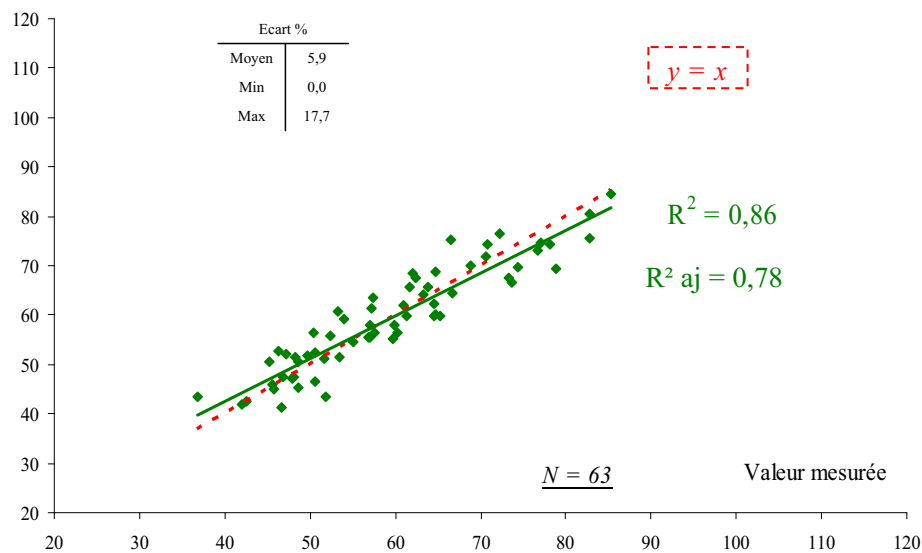


Figure 42. Différences entre les valeurs mesurée et prédites pour le ST-WB (Seconde équation)

Une droite d'équation $y = x$, résultant des différences nulles pour une équation parfaite, est représentée

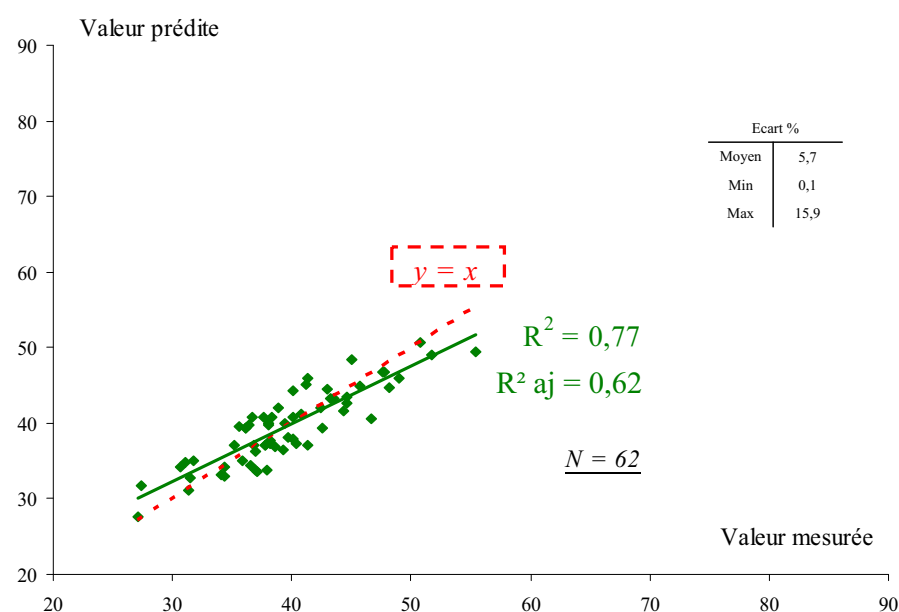


Figure 43. Différences entre les valeurs mesurée et prédites pour le LT-WB (Seconde équation)

Une droite d'équation $y = x$, résultant des différences nulles pour une équation parfaite, est représentée

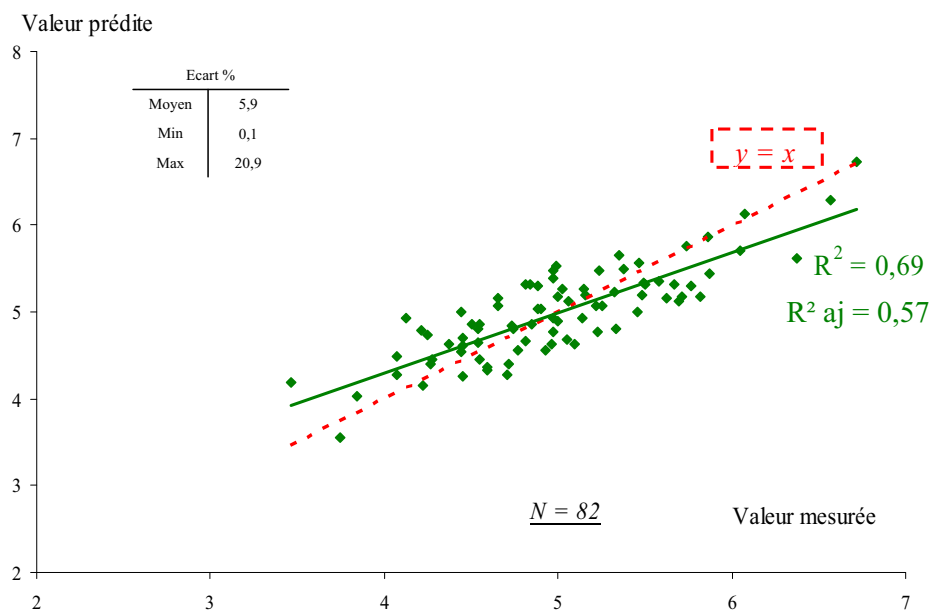


Figure 44. Différences entre les valeurs mesurée et prédites pour le LT-TG (Seconde équation)

Une droite d'équation $y = x$, résultant des différences nulles pour une équation parfaite, est représentée

A			B		
Protéine	Coefficient	P-value	Protéine	Coefficient	P-value
PRDX6	1,73	0,006	PRDX6	2,09	0,000
LDHB	-1,23	0,032	LDHB	-1,76	0,000
M_Calpaïne	1,43	0,169	Hsp70_1B	1,62	0,001
Hsp70_1B	0,97	0,180	MyosineIIX	0,35	0,007
u_Calpaïne	-1,01	0,274	Hsp40	-1,34	0,022
Hsp40	-0,87	0,301	Hsp70GRP75	1,54	0,036
Myosine II	-0,95	0,319	<i>u_Calpaïne</i>	<i>-1,03</i>	<i>0,068</i>
CRYAB	-0,55	0,341	<i>Eno1</i>	<i>0,98</i>	<i>0,092</i>
Eno1	0,72	0,362	<i>CRYAB</i>	<i>-0,59</i>	<i>0,093</i>
PGM	0,56	0,410	MyosineI	-0,54	0,160
Hsp27	-0,33	0,443	PGM	0,80	0,164
Hsp70/GRP75	0,93	0,460	MyBP_H	0,29	0,172
Myosine IIX	0,17	0,463	Desmine	-0,61	0,194
MDH1	0,40	0,688	M_Calpaïne	0,68	0,301
MLC-1F	-0,22	0,722	SOD1	-0,76	0,306
CapZ-β	-0,37	0,736	DJ_1	0,62	0,389
Desmine	-0,21	0,781	Enolase 3	-0,42	0,472
Myosine I	-0,17	0,799	MyosineII	-0,28	0,599
SOD1	-0,07	0,809	Hsp20	-0,19	0,617
Hsp20	-0,15	0,834	MLC_1F	-0,15	0,648
Enolase 3	0,17	0,870	MDH1	0,17	0,768
Hsp70-8	-0,16	0,872	Hsp27	-0,05	0,887
DJ-1	-0,15	0,901	CapZ	0,05	0,943
MyBP-H	-0,01	0,984	Hsp70-8	0,01	0,984
<i>Constante</i>	<i>46,78</i>	<i>0,005</i>	<i>Constante</i>	<i>33,93</i>	<i>0,001</i>

Tableau 19. Paramètres des équations du ST-WB

A. Première équation du ST-WB

B. Seconde équation du ST-WB

Les protéines significativement impliquées dans l'équation sont écrites en gras

62 échantillons une valeur de mesure WB prédite présentant une corrélation de 0,88 ($r^2 = 0,77$) avec les valeurs mesurées (Figure 43). Cette équation permet donc de calculer une valeur de mesure WB avec une marge d'erreur de 5,7 %.

Dans le muscle LT, la première régression sur l'ensemble des échantillons ($N = 111$) montre que l'abondance de la protéine PRDX6 intervient positivement sur la mesure WB (Tableau 20A). Ce résultat est confirmé par la seconde régression sur le groupe d'échantillons « prédictibles » ($N = 62$) (Tableau 20B). Cette deuxième régression montre également que l'abondance d'autres protéines intervient positivement sur la mesure WB : MyBP-H, Hsp20 (qui présentait déjà une tendance par la première régression), Enolase3 et MyHC-I. De même, l'abondance d'autres protéines intervient négativement avec la mesure WB : MyHC-IIx, Desmine, α B-crystalline et Hsp70-GRP75. L'abondance de la protéine Hsp40 intervient négativement avec la mesure WB mais seulement avec une tendance.

IV.3.4 Equation de prédiction de la note de tendreté globale du muscle LT

Une seconde régression linéaire a été effectuée sur les 82 échantillons dits « prédictibles » du muscle LT (soit 74 % de l'ensemble des échantillons) entre la note TG et les abondances des 24 protéines. L'équation établie par la régression a permis de calculer pour les 82 échantillons une valeur de note TG prédite présentant une corrélation de 0,83 ($r^2 = 0,69$) avec les valeurs mesurées (Figure 44). Cette équation permet donc de calculer une valeur de note TG avec une marge d'erreur de 5,9 %.

Pour la note TG du muscle LT, la première régression sur l'ensemble des échantillons ($N = 111$) a montré que l'abondance des protéines PRDX6 et MDH1 intervient négativement sur la note TG, et que les abondances des protéines CapZ- β et MyHC-I interviennent positivement (Tableau 21A). Ce résultat est confirmé par la seconde régression sur le sous-groupe des « prédictibles » ($N = 82$). Cette deuxième régression montre également que l'abondance d'autres protéines intervient positivement sur la note TG : M-calpaïne, LDHB et Enolase3. De même, l'abondance d'autres protéines intervient négativement sur la note TG : Desmine et μ -calpaïne (Tableau 21B). L'abondance des protéines Hsp40 et PGM intervient négativement sur la note TG, mais seulement avec une tendance. De même, les abondances des protéines Hsp27 et Hsp70-1B interviennent positivement sur la note TG mais seulement avec une tendance.

Une considération doit être faite au sujet de l'équation de prédiction de la note TG du muscle LT. En effet, cette équation se distingue des deux autres par les faibles valeurs des

A			B		
Protéine	Coefficient	P-value	Protéine	Coefficient	P-value
PRDX6	1,26	0,031	MyBP_H	0,62	0,000
<i>Hsp20</i>	<i>0,66</i>	<i>0,064</i>	Hsp20	0,97	0,000
<i>CRYAB</i>	<i>-0,45</i>	<i>0,067</i>	PRDX6	1,12	0,001
MyBP-H	0,37	0,109	MyosineIIX	-0,34	0,009
CapZ-β	-0,73	0,222	Enolase 3	1,02	0,016
DJ-1	0,95	0,237	MyosineI	0,62	0,018
MLC-1F	0,51	0,296	Desmine	-0,52	0,022
M_Calpaïne	-0,81	0,297	CRYAB	-0,35	0,032
Hsp40	-0,63	0,303	Hsp70GRP75	-0,74	0,046
Hsp70/GRP75	-0,74	0,320	<i>Hsp40</i>	<i>-0,68</i>	<i>0,082</i>
Myosine I	0,46	0,339	DJ_1	0,59	0,164
Myosine IIX	-0,21	0,343	u_Calpaïne	-0,54	0,206
Myosine II	-0,69	0,375	Hsp70_1B	-0,22	0,217
Eno1	-0,36	0,463	MDH1	-0,48	0,239
Desmine	-0,30	0,493	Hsp27	-0,25	0,244
Hsp70-8	0,43	0,548	MyosineII	-0,47	0,252
Hsp70_1B	0,19	0,561	Hsp70-8	0,44	0,312
SOD1	0,13	0,593	M_Calpaïne	-0,32	0,406
Enolase 3	0,35	0,665	CapZ	-0,27	0,417
LDHB	0,15	0,676	LDHB	-0,12	0,525
Hsp27	0,15	0,712	Eno1	-0,15	0,576
MDH1	0,20	0,780	SOD1	0,06	0,587
u_Calpaïne	-0,21	0,787	MLC_1F	0,05	0,856
PGM	-0,04	0,953	PGM	0,03	0,915
<i>Constante</i>	<i>25,72</i>	<i>0,083</i>	<i>Constante</i>	<i>32,49</i>	<i>0,000</i>

Tableau 20. Paramètres des équations du LT-WB

A. Première équation du LT-WB

B. Seconde équation du LT-WB

Les protéines significativement impliquées dans l'équation sont écrites en gras

A			B		
Protéine	Coefficient	P-value	Protéine	Coefficient	P-value
PRDX6	-0,15	0,002	CapZ	0,13	0,000
CapZ-β	0,14	0,003	PRDX6	-0,17	0,000
MDH1	-0,16	0,006	MyosineI	0,10	0,000
Myosine I	0,08	0,040	MDH1	-0,13	0,003
<i>Hsp70_1B</i>	<i>0,05</i>	<i>0,088</i>	M_Calpaïne	0,10	0,017
Hsp70/GRP75	0,09	0,125	LDHB	0,05	0,017
Eno1	-0,06	0,134	Enolase 3	0,09	0,026
MLC-1F	0,05	0,171	Desmine	-0,05	0,028
u_Calpaïne	-0,08	0,195	u_Calpaïne	-0,11	0,039
LDHB	0,04	0,224	<i>Hsp40</i>	<i>-0,06</i>	<i>0,062</i>
Hsp40	-0,05	0,270	<i>Hsp27</i>	<i>0,04</i>	<i>0,078</i>
M_Calpaïne	0,06	0,295	<i>PGM</i>	<i>-0,06</i>	<i>0,092</i>
Desmine	-0,03	0,326	<i>Hsp70_1B</i>	<i>0,03</i>	<i>0,095</i>
Enolase 3	0,06	0,370	Eno1	-0,05	0,130
SOD1	0,02	0,424	Hsp70GRP75	0,05	0,178
DJ-1	-0,05	0,428	SOD1	0,01	0,290
Myosine II	0,05	0,458	MLC_1F	0,03	0,295
PGM	-0,03	0,561	MyosineIIX	0,01	0,373
Hsp70-8	-0,03	0,584	MyBP_H	-0,01	0,440
MyBP-H	-0,01	0,635	Hsp70-8	-0,02	0,660
Hsp27	0,01	0,695	Hsp20	-0,01	0,685
Myosine IIX	0,00	0,780	CRYAB	0,00	0,727
Hsp20	-0,01	0,805	MyosineII	-0,01	0,865
CRYAB	0,00	0,994	DJ_1	0,00	0,984
<i>Constante</i>	<i>5,20</i>	<i>0,000</i>	<i>Constante</i>	<i>5,35</i>	<i>0,000</i>

Tableau 21. Paramètres des équations du LT-TG

A. Première équation du LT-TG

B. Seconde équation du LT-TG

Les protéines significativement impliquées dans l'équation sont écrites en gras

coefficients de l'abondance des protéines, malgré la significativité de certaines. Cela n'empêche certes pas de prédire la note TG avec une valeur de r^2 de 0,69 avec l'ensemble des 24 protéines, mais cela relativise la désignation comme marqueur de dureté et de tendreté des protéines présentant des coefficients proches du 0. Une protéine présentant un coefficient positif est désignée comme marqueur positif de la tendreté, tandis qu'une protéine présentant un coefficient négatif est désignée comme marqueur négatif. Or, il en faut peu pour qu'un marqueur de dureté avec un coefficient négatif de -0,05 (exemple de la desmine) soit en réalité un marqueur de tendreté avec un coefficient très légèrement positif (de +0,05 par exemple). Ainsi, la distinction entre marqueur positif ou négatif de tendreté n'est pas très fiable d'après les résultats de la régression effectuée sur les notes TG du muscle LT.

IV.3.5 Marqueurs communs

Les différentes régressions montrent que la protéine PRDX6 est la seule dont l'abondance explique significativement la mesure WB et la note TG dans les deux muscles LT et ST. L'étude de Jia *et al.* (2009) montre que PRDX6 est corrélée positivement avec la note TG du muscle LT, ce qui en fait un marqueur de tendreté. Cependant nos résultats montrent que cette protéine, étant corrélée positivement avec la mesure WB et négativement avec la note TG, est un marqueur de la dureté dans les muscles LT et ST.

L'abondance de la protéine Hsp40 intervient négativement sur la mesure WB des muscles ST et LT, et sur la note TG du muscle LT. Ce résultat pointe une contradiction sur le rôle de Hsp40 dans la mesure WB et note TG, ces deux estimations de la tendreté étant corrélées négativement. Cependant, la corrélation entre l'abondance de Hsp40 et la mesure WB et note TG dans le muscle LT ne présente qu'une tendance, ce qui oblige à relativiser la qualification de rôle positif ou négatif sur la tendreté de Hsp40. Ceci est particulièrement vrai pour la note TG, Hsp40 présentant un coefficient proche de 0 dans l'équation prédictive établie sur la note TG (coefficient de -0,06). L'abondance de l' α B-crystalline intervient négativement sur la mesure WB dans les 2 muscles, ce qui montre un rôle identique de cette protéine dans la tendreté du ST et du LT. Cependant, l'abondance de cette protéine n'explique pas de manière significative la mesure WB du muscle ST, mais seulement avec une tendance. L'abondance de la protéine Hsp70-GRP75 intervient positivement sur la mesure WB du muscle ST, et négativement dans le muscle LT, ce qui montre une opposition des deux muscles compatible avec des effets muscle.

L'abondance de la MyHC-I est corrélée positivement à la fois sur la mesure WB et la note TG dans le muscle LT, ce qui est en contradiction avec la nature opposée de ces deux estimations de la tendreté. Cependant, étant donné que la valeur du coefficient déterminée par l'équation de la tendreté sensorielle est proche de 0 (coefficient de 0,1), le qualificatif de la myosine I comme marqueur positif de la tendreté globale n'est pas fiable. La MyHC-I est l'isoforme de chaîne lourde de myosine impliquée dans la contraction lente, abondante dans un muscle comme le LT. Il est donc intéressant que son abondance puisse être un marqueur de la tendreté du LT.

L'abondance de la Myosine IIX, isoforme de chaîne lourde de myosine impliquée dans la contraction rapide de muscles comme le ST, est corrélée positivement sur la mesure WB de ce muscle, et négativement dans le muscle LT. La Myosine IIX est donc en opposition avec la Myosine I dans le LT pour la mesure WB. D'après cette analyse, les isoformes de chaînes lourdes de myosine typiques d'un muscle pourraient donc constituer des marqueurs de tendreté pertinents au sein de ce muscle. Ces résultats sont en accord avec ceux de Picard *et al* (2007).

L'abondance de la LDHB, enzyme glycolytique, est corrélées négativement avec la mesure WB du muscle ST, et positivement avec la note TG du muscle LT. A l'instar de MyHC-I, LDHB présente un coefficient dans l'équation de la note TG proche de 0 (coefficient de 0,05). Le sens de la corrélation entre l'abondance de LDHB avec la note TG du muscle LT (positive) n'est donc pas fiable.

IV.3.6 Echantillons dits « imprédictibles »

La première régression effectuée sur chaque muscle a permis de distinguer des échantillons « prédictibles » et « imprédictibles » sur la base de la marge d'erreur de prédiction des échantillons. La valeur maximale de cette marge, permettant de distinguer les échantillons « prédictibles » des « imprédictibles » a été fixée arbitrairement à 15 %, sans tenir compte de facteurs biologiques, mais en prenant en considération des limites d'acceptation d'erreur pour une équation de prédiction fiable.

Cependant, les régressions linéaires effectuées sur les échantillons « imprédictibles » montrent clairement que pour les muscles ST et LT, et pour la mesure WB et note TG, aucune abondance de protéine n'intervient significativement sur la mesure ou note considérée (Tableau 22 pour le ST-WB, Tableau 23 pour le LT-WB, Tableau 24 pour le LT-TG). Les équations établies à partir de ces régressions ne permettent pas de prédire des mesures WB et

Protéine	Coefficient	P-value
M_Calpaïne	3,07	0,310
PRDX6	1,47	0,551
u_Calpaïne	-1,66	0,578
MyosineII	-0,42	0,658
Eno1	1,14	0,662
CRYAB	-0,88	0,666
Enolase 3	1,64	0,675
MyBP_H	-0,34	0,714
MyosineI	-1,07	0,718
MLC_1F	-1,11	0,718
Hsp40	-1,20	0,733
DJ_1	-1,35	0,741
Hsp27	-0,47	0,778
Hsp20	0,84	0,795
LDHB	-0,47	0,798
Hsp70GRP75	0,93	0,827
MDH1	-0,78	0,842
Hsp70-8	-0,52	0,855
MyosineI	0,37	0,870
PGM	0,33	0,873
SOD1	0,05	0,936
Hsp70_1B	-0,14	0,959
Desmine	0,04	0,989
CapZ	0,01	0,997
Constante	66,53	0,341

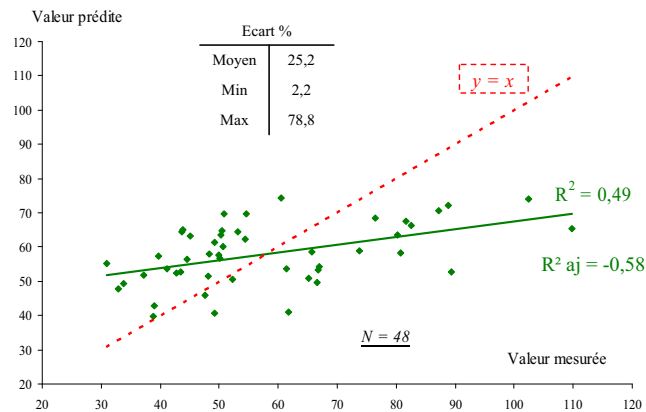


Figure 45. Différences entre les valeurs mesurée et prédites pour le ST-WB – Imprédictibles (Seconde équation)

Une droite d'équation $y = x$, résultant des différences nulles pour une équation parfaite, est représentée

Tableau 22. Paramètres des équations du ST-WB - Imprédictibles

Protéine	Coefficient	P-value
CRYAB	-0,81	0,332
M_Calpaïne	-2,39	0,350
PRDX6	1,80	0,418
Eno1	-1,27	0,481
DJ_1	1,78	0,558
SOD1	0,80	0,563
Hsp27	0,84	0,575
Hsp70_1B	0,77	0,608
MyBP_H	0,31	0,629
Desmine	0,93	0,631
Hsp70-8	1,21	0,664
MyosineII	-1,62	0,686
MLC_1F	0,59	0,720
MDH1	0,76	0,732
Hsp40	-0,56	0,736
CapZ	-0,77	0,749
MyosineI	-0,55	0,754
PGM	-0,62	0,788
LDHB	0,37	0,790
Enolase 3	-0,82	0,809
u_Calpaïne	-0,63	0,813
MyosineII	-0,17	0,814
Hsp20	-0,28	0,820
Hsp70GRP75	-0,18	0,949
Constante	44,75	0,417

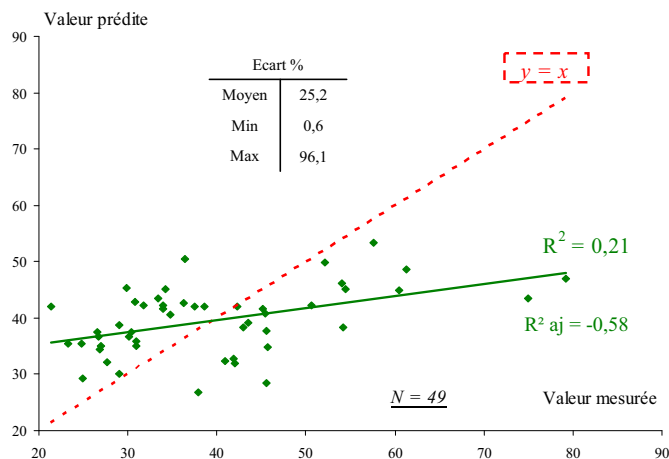


Figure 46. Différences entre les valeurs mesurée et prédites pour le LT-WB – Imprédictibles (Seconde équation)

Une droite d'équation $y = x$, résultant des différences nulles pour une équation parfaite, est représentée

Tableau 23. Paramètres des équations du LT-WB - Imprédictibles

Protéine	Coefficient	P-value
MyBP_H	0,13	0,384
MyosineI	-0,20	0,529
Hsp27	-0,20	0,536
u_Calpaïne	0,33	0,547
Desmine	0,22	0,556
Hsp70GRP75	0,44	0,662
CapZ	-0,22	0,665
MLC_1F	-0,09	0,683
MyosineII	0,05	0,726
Enolase 3	-0,34	0,729
SOD1	-0,23	0,775
Hsp20	0,06	0,805
Hsp40	0,12	0,809
CRYAB	-0,06	0,821
DJ_1	0,14	0,833
Hsp70-8	-0,09	0,852
MDH1	-0,08	0,866
Eno1	0,05	0,867
M_Calpaïne	-0,11	0,888
Hsp70_1B	-0,04	0,902
MyosineI	0,06	0,920
PRDX6	0,04	0,963
PGM	-0,01	0,969
LDHB	0,01	0,979
Constante	4,22	0,645

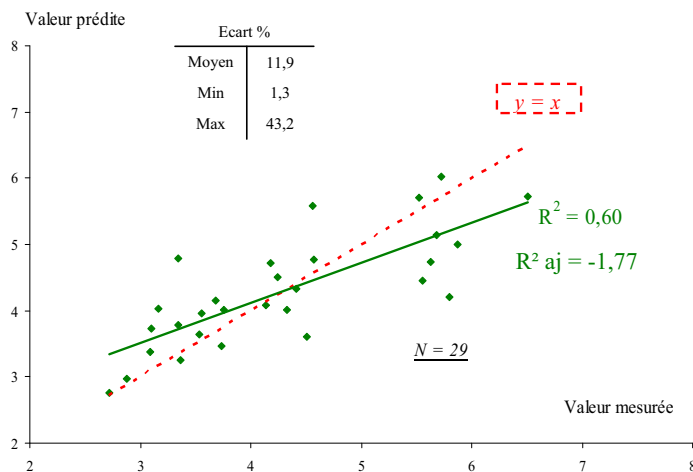


Figure 47. Différences entre les valeurs mesurée et prédites pour le LT-TG – Imprédictibles (Seconde équation)

Une droite d'équation $y = x$, résultant des différences nulles pour une équation parfaite, est représentée

Tableau 24. Paramètres des équations du LT-TG - Imprédictibles

notes TG suffisamment fiables, compte-tenu de la marge d'erreur des équations (Figure 45 pour le ST-WB, Figure 46 pour le LT-WB, Figure 47 pour le LT-TG). La limite arbitraire de 15 % d'erreur trouve donc une signification puisque ces échantillons « imprédictibles » sont bien différents des échantillons « prédictibles » en terme de relation entre abondances de protéines et tendreté. De plus, les équations établies sur les échantillons « imprédictibles » présentent pour certaines protéines des coefficients très différents de ceux des équations sur les échantillons « prédictibles » (exemple de Hsp70-1A avec un coefficient de +1,62 dans l'équation des « prédictibles » contre -0,14 dans l'équation des « imprédictibles »). La tendreté dans ces échantillons doit répondre à d'autres mécanismes cellulaires, mettant en jeu d'autres protéines. Des analyses de variance n'ont pas permis de distinguer ces deux groupes au niveau de l'abondance des 24 protéines, des caractéristiques phénotypiques et des notes TG et mesures WB. Ces échantillons « imprédictibles » ne sont pas distingués par une forte proportion de bœufs ou taurillons, ni par des mesures WB et note TG extrêmes. Cela renforce l'hypothèse que ces deux groupes d'individus ne répondent pas aux mêmes mécanismes pour l'élaboration de la tendreté. Il serait donc intéressant d'étudier d'autres protéines d'intérêt et caractéristiques phénotypiques pour pouvoir les différencier.

IV.3.7 Conclusions de l'Analyse Prédictive Globale

Cette analyse a montré que le stress oxydant, ou plus exactement les mécanismes cellulaires en relation avec lui, joue un rôle important dans la prédiction de la tendreté. En effet, le stress oxydant est représenté dans les 3 équations finales, par l'implication des protéines de la famille des HSPs et PRDX6.

En conclusion, cette approche a permis de distinguer des échantillons « prédictibles » et d'autres « imprédictibles », ce qui modifie l'approche qui considérerait la tendreté comme obéissant aux mêmes mécanismes dans un même contexte. Or, les équations montrent que si le groupe d'échantillons « prédictibles » répond aux mécanismes ciblés par cette étude, il n'en est rien pour les « imprédictibles », qui répondent vraisemblablement à d'autres mécanismes. Ainsi, ces résultats nous obligent à prendre en considération une variation intra-contexte jusqu'alors ignorée devant les variations inter-contextes (effets muscles races, type d'animal).

Cette approche a permis d'établir des équations de prédiction satisfaisantes, certes sur une sous-population d'échantillons, mais qui prédisent les mesures et note de

tendreté avec une fiabilité bien supérieure aux autres approches développées jusqu'à présent. Elle a également mis en évidence des protéines dont l'abondance intervient sur la tendreté, en particulier PRDX6, qui est un marqueur pertinent quel que soit le contexte d'analyse. De manière plus globale, cette approche a montré l'importance du stress oxydant et de l'apoptose dans la tendreté.

IV.4 Analyse prédictive ciblée

Cette approche consiste à effectuer une régression multiple pas-à-pas sur les muscles LT d'une part et ST d'autre part, faisant ressortir les protéines les plus explicatives de la mesure WB (muscle LT et ST) ou de la note TG (muscle LT). Contrairement à l'approche prédictive globale, l'approche prédictive ciblée fait ressortir les protéines les plus explicatives de la tendreté, et leur attribue un coefficient dans une équation de prédiction soit de la mesure Warner-Bratzler (pour le muscle LT et le muscle ST séparément), soit de la note de tendreté sensorielle (pour le muscle LT seulement).

IV.4.1 Muscle LT

Pour le muscle LT, les résultats de cette approche (Tableau 25) montrent que Eno1, MyBP-H et PRDX6 expliquent respectivement 4,2, 2,6 et 1,8 % de la variabilité de la mesure WB (Figure 48), soit 8,6 % au total. Tandis que Eno1 intervient négativement sur la prédiction de la mesure WB (coefficient -0,84), MyBP-H et PRDX6 interviennent positivement (coefficients +0,32 et +0,5 respectivement). Cette prédiction est trop faible pour pouvoir être considérée comme fiable.

En ce qui concerne la note TG du muscle LT, les protéines Hsp27, CapZ- β , MDH1, PRDX6 et Hsp70-GRP75 expliquent respectivement 3,6, 3,8, 6,1, 3,9 et 2,95 % de la variabilité de la note de tendreté (Figure 49), soit 20,35 % au total (Tableau 25). Les protéines Hsp27, MDH1 et PRDX6 interviennent négativement sur la note TG (coefficients -0,02, -0,13 et -0,1 respectivement), contrairement aux protéines CapZ- β et Hsp70-GRP75 qui interviennent positivement (coefficients +0,14 et +0,075 respectivement). C'est une prédiction avec une précision trop faible pour être utilisée dans un test, mais toutefois supérieure à l'équation générée pour la mesure WB.

Ainsi, dans le muscle LT, la note TG est beaucoup plus prédictible que la mesure WB. Seule la protéine PRDX6 est commune aux deux évaluations de la tendreté (mesure WB et note TG).

LT - Mesure de Warner-Bratzler

Protéine	Variabilité expliquée	Coefficient dans l'équation	Significativité
Eno1	4,2 %	- 0,84	P = 0,03
MyBP-H	2,6 %	0,32	P = 0,09
PRDX6	1,8 %	0,5	P = 0,15

Ordonnée à l'origine : 37,72

LT - Note de Tendreté Sensorielle

Protéine	Variabilité expliquée	Coefficient dans l'équation	Significativité
Hsp27	3,6 %	- 0,02	P = 0,05
CapZ-β	3,8 %	0,14	P < 0,001
MDH1	6,1 %	- 0,13	P = 0,001
PRDX6	3,9 %	- 0,1	P = 0,005
Hsp70-GRP75	2,95 %	0,075	P = 0,05

Ordonnée à l'origine : 5,64

ST - Mesure de Warner-Bratzler

Protéine	Variabilité expliquée	Coefficient dans l'équation	Significativité
PRDX6	12,8 %	1,02	P < 0,001
Hsp27	8,5 %	- 0,93	P < 0,001
Hsp70-8	3,9 %	1,35	P = 0,02

Ordonnée à l'origine : 34,83

Tableau 25. Résultats de l'approche prédictive ciblée

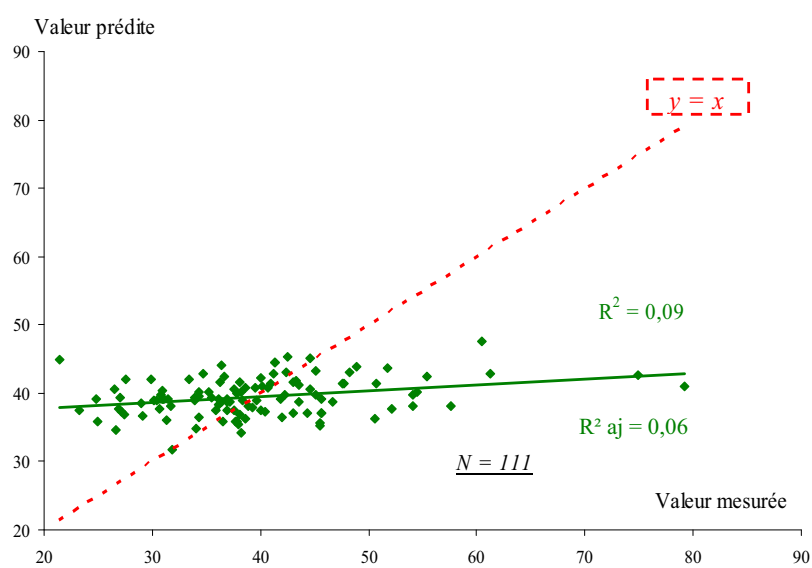


Figure 48. Différences entre les valeurs mesurée et prédites pour le LT-WB (analyse ciblée)

Une droite d'équation $y = x$, résultant des différences nulles pour une équation parfaite, est représentée

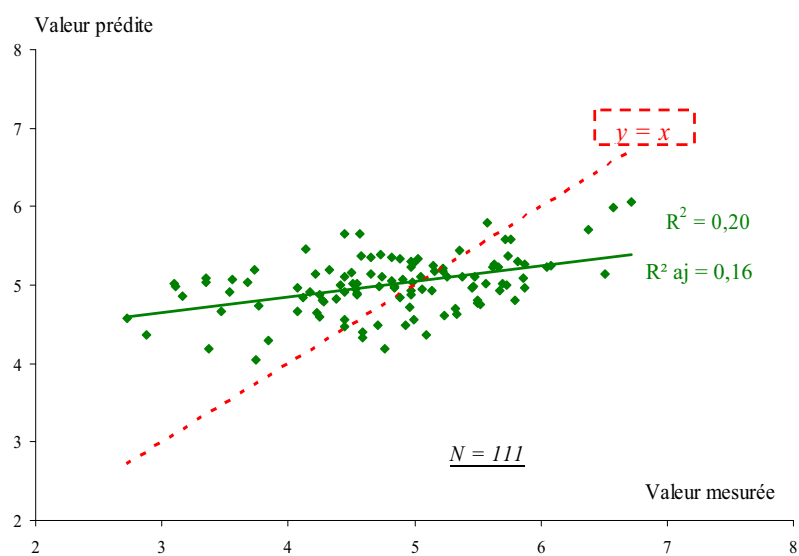


Figure 49. Différences entre les valeurs mesurée et prédites pour le LT-TG (analyse ciblée)

Une droite d'équation $y = x$, résultant des différences nulles pour une équation parfaite, est représentée

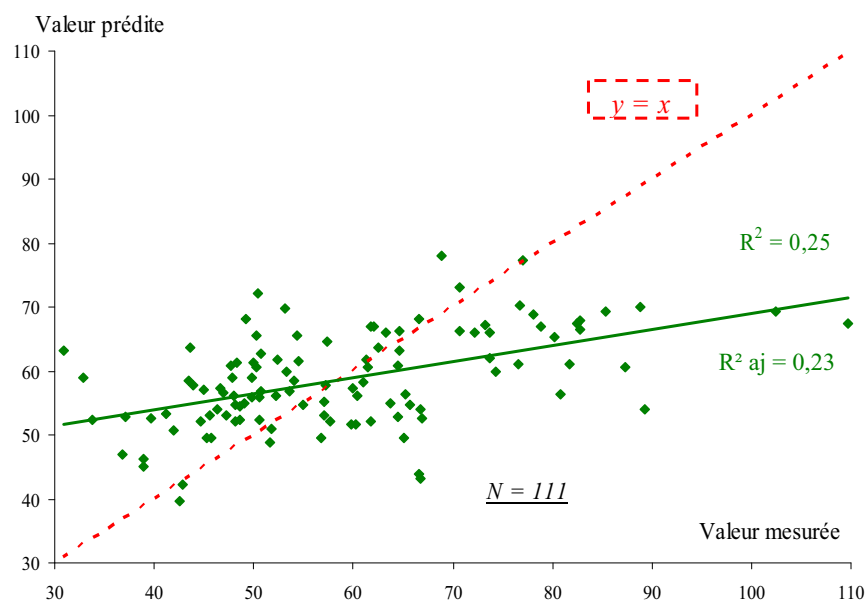


Figure 50. Différences entre les valeurs mesurée et prédites pour le ST-WB (analyse ciblée)

Une droite d'équation $y = x$, résultant des différences nulles pour une équation parfaite, est représentée

IV.4.2 Muscle ST

Dans le muscle ST, les protéines Hsp27, PRDX6 et Hsp70-8 expliquent respectivement 8,5, 12,8 et 3,9 % de la variabilité de la mesure WB (Figure 50), soit 31,2 % au total (Tableau 25). Hsp27 intervient négativement sur la mesure WB (coefficient -0,93), contrairement à PRDX6 et à Hsp70-8 qui interviennent positivement (coefficients +1,02 et +1,35 respectivement). Tout comme la note TG du LT, cette prédiction est trop faible pour être utilisée dans un test. C'est cependant la meilleure prédictibilité obtenue par cette approche.

Les équations de prédiction obtenues sur les deux muscles ne permettent pas de prédire une note TG ou une mesure WB avec suffisamment de précision. Cependant, les résultats montrent particulièrement l'importance des protéines Hsp27 et PRDX6 dans la tendreté des muscles LT et ST. Hsp27 intervient négativement aussi bien sur la note TG (muscle LT) que sur la mesure WB (muscle ST), un résultat qui pose question. Le sens de la relation (positive ou négative) entre l'abondance de Hsp27 avec la tendreté pourrait donc dépendre des propriétés du muscle considéré. Par contre PRDX6 intervient positivement sur la mesure WB et négativement sur la note TG, des résultats étant cohérents puisque mesure WB et note TG sont connus pour être corrélées négativement. PRDX6 serait un marqueur de dureté de la viande.

Les résultats permettent également de valider le rôle dans la tendreté des protéines Eno1, MyBP-H, CapZ- β , Hsp70-GRP75 et MDH1.

En conclusion, cette approche n'a pas permis d'établir des équations satisfaisantes et robustes pour prédire la tendreté. Cependant, les résultats permettent de confirmer le rôle important pour la tendreté des protéines Hsp27 et PRDX6, et de souligner l'implication des protéines Eno1, MyBP-H, CapZ- β , Hsp70-GRP75 et MDH1 comme marqueurs potentiels de la tendreté.

IV.5 Synthèse des résultats sur la tendreté

IV.5.1 Les validations de protéines en tant que marqueurs de la tendreté

Les différentes analyses effectuées au cours de la thèse (les corrélations, les classes, l'analyse globale, l'analyse ciblée) ont permis de valider de manière concordante le rôle dans la tendreté de plusieurs protéines (Tableau 26). Les approches par corrélation et par classe, permettant de décrire la tendreté, donnent des résultats quasiment identiques. Ces deux

Protéine	ST-WB				LT-WB				LT-TG				Protéine
	Corrélation	Classe	APG	APC	Corrélation	Classe	APG	APC	Corrélation	Classe	APG	APC	
Heat Shock Proteins													Heat Shock Proteins
αB-crystalline	-	-	- (t)				-						αB-crystalline
Hsp20	-	-			+		+						Hsp20
Hsp27	-	-		-					-		+	(t)	Hsp27
Hsp40			-				- (t)				- (t)		Hsp40
Hsp70-1A			+								+	(t)	Hsp70-1A
Hsp70-8	+	+		+			-						Hsp70-8
Hsp70-GRP75	+	+	+								+		Hsp70-GRP75
Métabolisme													Métabolisme
Eno1			+	(t)	-			-					Eno1
Eno3	+	+					+				+		Eno3
LDHB			-								+		LDHB
MDH1											-		MDH1
PGM1											- (t)		PGM1
Structure													Structure
CapZ-β	+										+		CapZ-β
Desmine							-				-		Desmine
MLC-1F	+	+											MLC-1F
MyBP-H							+	+					MyBP-H
MyHC-I							+				+		MyHC-I
MyHC-II													MyHC-II
MyHC-IIx		+	+					-					MyHC-IIx
Stress oxydant													Stress oxydant
DJ-1													DJ-1
PRDX6	+	+	+	+			+				-		PRDX6
SOD1													SOD1
Protéolyse													Protéolyse
M-calpain	+	+									+		M-calpain
μ-calpaïne	+	+	- (t)								-		μ-calpaïne

Tableau 26. Synthèse des résultats de la validation des 24 protéines comme marqueur de tendreté obtenus par les 4 analyses

(t) : protéine dont la corrélation avec la mesure WB ou la note TG n'est pas significative mais présente une tendance.
Les protéines grisées sont celles qui n'ont pas été validées significativement par les 4 approches.
APG : Analyse Prédictive Globale
APC : Analyse Prédictive Ciblée

approches montrent que la tendreté du muscle LT n'est pas aussi bien décrite par l'ensemble des paramètres analysés (abondances de protéines et caractéristiques phénotypiques) que la tendreté du muscle ST. Les approches prédictives globales et ciblées donnent des résultats qui, même s'ils ne pas identiques, ne sont pas contradictoires, certaines protéines étant retrouvées par les deux approches à la fois. Aucune de ces 4 approches ne donne de résultat opposé à une autre approche dans un contexte donné, à l'exception de la μ -calpaïne dans le ST-WB et Hsp27 dans le LT-TG. Cependant, ces deux protéines ne présentent qu'une tendance dans l'approche prédictive globale. L'ensemble de ces résultats montre la fiabilité de ces 4 approches différentes.

Trois protéines se dégagent des autres par ces analyses : Hsp27, Hsp70-GRP75 et PRDX6. Ces trois protéines sont les seules dont l'abondance intervient significativement sur la mesure WB du ST par au moins 3 approches, négativement pour Hsp27 et positivement pour PRDX6 et Hsp70-GRP75.

Le groupe des protéines HSP20s (α B-crystalline, Hsp20 et Hsp27) est très impliqué dans la tendreté du ST comme marqueur négatif de la mesure WB, d'après les 4 analyses. Ces protéines ayant une fonction chaperonne, anti-oxydante et anti-apoptotique, la protection de l'intégrité protéique et cellulaire semble avoir un rôle positif dans la tendreté du ST. Cette importance de la protection de protéines est retrouvée pour la mesure WB du muscle LT seulement pour l' α B-crystalline. A l'inverse, la relation positive entre Hsp20 et la mesure WB du muscle LT suggère un effet inverse de cette protéine sur la tendreté pour ce muscle. Le potentiel oxydatif du muscle jouerait donc un rôle important dans la tendreté, mais différent selon les muscles.

Les protéines HSP70s (Hsp70-1A, Hsp70-8 et Hsp70-GRP75) sont intéressantes. En effet, l'abondance de ces protéines intervient positivement sur la mesure WB du muscle ST, contrairement aux HSP20s.

Dans ce muscle, il est très intéressant de constater la relation inverse entre l'abondance des HSP20s, intervenant négativement sur la mesure WB, et l'abondance des HSP70s, intervenant positivement sur la mesure WB.

Le rapport entre les abondances des protéines HSP20s (anti-apoptotiques, chaperonnes anti-oxydantes) et HSP70s (chaperonnes universelles) serait donc un marqueur de tendreté surtout dans le ST.

La protéine Hsp40, chaperonne impliquée dans les stress oxydants, est codée par le gène DNAJA1 dont l'expression comme marqueur négatif de la tendreté sensorielle a été brevetée. Les résultats ne permettent pas d'affirmer que l'abondance de cette protéine intervient sur la tendreté. En effet, seule l'approche prédictive globale a montré que l'abondance de Hsp40 intervient négativement sur la mesure WB du ST. Cette approche a également montré une tendance négative entre l'abondance de cette protéine et la mesure WB et note TG du muscle LT, ce qui est contradictoire. Le faible coefficient déterminé sur la tendreté sensorielle (-0,06) ne permet pas d'être affirmatif sur le sens de la relation entre Hsp40 et tendreté sensorielle. De manière plus globale, l'abondance de cette protéine n'a pas été validée comme marqueur de tendreté mais permet de confirmer la relation négative entre stress oxydant et tendreté dans le muscle ST.

La protéine PRDX6, enzyme intervenant dans la lutte contre le stress oxydant, est validée comme marqueur négatif de tendreté du ST par les 4 approches, de note de tendreté sensorielle et de mesure WB du LT par deux approches, ce qui fait de PRDX6 la protéine la plus validée dans différents contextes par ce travail. Toutes les approches montrent que l'abondance de cette protéine est un marqueur négatif de la tendreté (intervenant positivement sur la mesure WB et négativement sur la note TG), quel que soit le contexte. Ainsi, le stress oxydant de la cellule aurait donc toujours un impact négatif sur la tendreté, en stimulant l'expression de protéines négativement corrélées à la tendreté. Bien que les protéines DJ-1 et SOD1 soient impliquées dans la lutte contre le stress oxydant, ces protéines ne sont pas validées comme marqueur de tendreté, aucune approche ne permettant d'établir une relation entre l'abondance de ces protéines et la mesure WB ou note TG. Cependant, SOD1 a été identifiée comme un marqueur très spécifique du ST de bœufs.

Les différentes approches n'ont pas permis de dégager un rôle net des enzymes du métabolisme (Eno1, Eno3, LDHB, MDH1 et PGM). La relation positive entre l'abondance d'Enolase 3 avec la mesure WB du ST est en concordance avec la mesure WB du LT. En revanche, il y a une opposition entre les résultats sur la mesure WB et la note TG du LT. En effet, l'abondance d'Enolase 3 est corrélée aussi positivement avec la note TG, alors que ces deux évaluations de la tendreté sont opposées. Les résultats montrent une relation négative entre l'abondance d'Enolase 1 et la mesure WB du LT, en opposition avec les résultats sur Enolase 3 dans ce même contexte. Le rôle négatif de l'abondance de MDH1 sur la note TG du LT, validée par deux approches, n'est retrouvé dans aucun autre contexte. Quant à LDHB,

bien qu'étant fortement impliquée dans l'équation prédictive de la mesure WB du ST par l'approche globale, son rôle dans la tendreté n'est pas confirmée par d'autres approches mis à part dans la note TG du LT. Aucune approche n'a permis d'établir un lien significatif entre PGM et tendreté. L'abondance de ces enzymes ne semble pas avoir un rôle important dans la tendreté. De plus, les analyses phénotypiques des classes de tendreté ont montré que les activités des enzymes métaboliques n'expliquent ni les mesures WB ni les notes TG. Ainsi, les enzymes du métabolisme énergétique ne sont pas validées comme marqueur de tendreté.

Les protéines de structure, contrairement à ce que laisse penser leur importance dans la cohésion cellulaire, n'ont pas de rôle très clair dans la tendreté, certaines de ces protéines étant validées par peu d'approches. Ainsi, CapZ- β est validée par deux approches comme étant un marqueur positif de la note TG du muscle LT, MyBP-H comme marqueur positif de la mesure WB du muscle LT, et MLC-1F comme marqueur positif de la mesure WB du muscle ST. Ces deux dernières protéines étant plutôt associées au type contractile rapide, celui-ci serait donc défavorable pour la tendreté dans les deux muscles. La relation entre l'abondance des chaînes lourdes de myosine et la tendreté n'est validée que par une seule analyse.

De manière assez surprenante, l'abondance des enzymes de la protéolyse, les calpaïnes, n'a pas été validée comme marqueur de tendreté du LT, alors que des polymorphismes des gènes codant ces enzymes sont utilisés dans les tests de prédiction de la tendreté australiens et américains. L'analyse prédictive globale a montré une corrélation négative entre l'abondance de la μ -calpaïne et la note TG, opposée à une corrélation positive entre l'abondance de la M-calpaïne et cette même note TG. Dans le muscle ST, les analyses par corrélations et par classe montrent que l'abondance de ces enzymes intervient négativement sur la tendreté.

En conclusion, ce travail a permis de valider, dans le ST, comme marqueur positif de tendreté surtout Hsp27 et de manière plus globale les HSP20s, et comme marqueur négatif les HSP70s. Ainsi, le rapport HSP20s / HSP70s pourrait être une variable importante dans la tendreté du ST. Les calpaïnes sont des marqueurs négatifs de la tendreté du ST.

Dans les deux muscles, les protéines de structure et du métabolisme ne sont pas de bons marqueurs de tendreté. Cependant, les protéines Eno3, MDH1, CapZ- β , MLC-1F et MyBP-H sont plus intéressantes que les autres car leur abondance est liée à la

tendreté (mesures WB ou note TG) dans certains contextes. Les résultats ont montré une grande importance du stress oxydant, par la validation de PRDX6 et son implication dans la tendreté à la fois dans les muscles ST et LT, pour les mesures WB et notes TG.

Ce travail a validé plus de marqueurs dans le ST que dans le LT.

IV.5.2 Les équations de prédiction de la tendreté

Les approches prédictives globales et ciblées ont permis d'établir des équations pour la mesure de WB du LT et du ST, et pour la note TG du LT. L'approche prédictive globale a permis de développer des équations fiables (70 à 90 % de la variance expliquée) mais sur la moitié des échantillons. Le groupe dit « imprédictible » ne répond pas aux 24 protéines étudiées et reste à caractériser pour être différencié des échantillons dits « prédictibles ».

L'approche prédictive ciblée a développé des équations sur l'ensemble des échantillons, expliquant une faible variabilité (de 7 à 30 %). Ainsi, afin d'expliquer au mieux la tendreté, il est nécessaire de considérer le plus de protéines possible dans l'équation. Il serait cependant plus judicieux de remplacer les protéines les moins explicatives de la tendreté dans les équations par d'autres, qui pourraient être validés par des études ultérieures.

Les deux approches prédictives, globale et ciblée, sont complémentaires l'une de l'autre. Les équations confirment le rôle important du stress oxydant dans la tendreté, par l'implication des protéines Hsp27 et PRDX6.

En conclusion, ce travail a permis de générer les premières équations de tendreté fiables sur un système d'élevage français. Certaines protéines comme PRDX6 et Hsp27 sont des paramètres importants. Les équations restent cependant à améliorer, analysant d'autres protéines d'intérêt pour la tendreté et en les incorporant dans l'équation, remplaçant ainsi les protéines les moins explicatives de la tendreté figurant dans les équations développées par ce travail.

V Interactome fonctionnel

Une cellule eucaryote comporte environ 3 millions de protéines et des centaines de mécanismes cellulaires différents. Identifier des marqueurs protéiques permet de cibler quelques mécanismes directement liés à ces protéines, mais pas de les replacer dans le contexte général de la cellule. Un mécanisme ne fonctionnant jamais de manière isolé, et les

protéines étant généralement impliquées dans diverses voies, il est donc nécessaire d'avoir une vision globale des marqueurs de tendreté dans leur contexte de fonctionnement. Une telle vue permet en effet de mieux comprendre et appréhender la tendreté. Car cette qualité n'est pas un mécanisme cellulaire, c'est la somme de plusieurs. Ces mécanismes peuvent être liés, et la surexpression d'un groupe de protéines (par des facteurs environnementaux ou génétiques) peut faire basculer tel ou tel mécanisme, et *in fine* avoir un impact fort sur la tendreté. C'est pourquoi la réalisation d'un interactome de la tendreté permettrait d'une part, de synthétiser les informations sur les protéines, et d'autre part d'avoir une vue globale de la tendreté.

Un interactome est une carte d'interaction des protéines d'une cellule (Cusick *et al* 2005). Celui-ci peut illustrer uniquement un mécanisme ou une réaction, une maladie, ou synthétiser l'ensemble des connaissances cellulaires. Ces interactomes se construisent à partir de données expérimentales ou bibliographiques, démontrant ou décrivant les relations entre protéines. Les bases de données sont disponibles pour des organismes modèles tels que *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Mus musculus*, ou encore *Homo sapiens*. En revanche, le bovin *Bos taurus* ne dispose pas de telles bases. Le bovin étant très proche de l'humain, il est donc possible de travailler à partir de bases de données humaines, ces dernières étant très bien annotées et assez complètes.

Dans une première partie, l'interactome à proprement parler a été généré à partir de la liste des 24 protéines étudiées au cours de la thèse. Puis dans une seconde partie, une intégration des données expérimentales obtenus sur la prédiction de la tendreté a permis d'illustrer et de mieux comprendre l'ensemble des réactions moléculaires impliqués dans l'élaboration de la tendreté dans les muscles ST et LT, pour la mesure WB, et également l'effet du type du muscle. L'ensemble de cette analyse a fait l'objet d'une publication. La note TG du muscle LT n'a pas été illustrée car les faibles implications des protéines dans cette note ne permettent pas de réaliser un interactome clair.

Article Journal of Proteomics

Functional analysis of beef tenderness

Nicolas Guillemin, Muriel Bonnet, Catherine Jurie, Brigitte Picard*.

INRA, UR1213, Unité de Recherches sur les Herbivores, Centre de Clermont-Ferrand/Theix, Saint-Genès-Champanelle, F-63122 France.

* Corresponding author. Phone: +33 4 73 62 40 56. Fax: +33 4 73 62 46 39. E-mail address: brigitte.picard@clermont.inra.fr

Keywords: tenderness, interactome, proteomics, muscle effect, pathways.

Abstract

Meat tenderness is a complex assembly of different cellular pathways. As a consequence, genomics studies have revealed a lot of different proteins considered as tenderness markers. So, it is difficult to have an overview of tenderness in term of cellular pathways. This work analyzed cellular pathways of tenderness and designed an interactome of tenderness, and proposed explanations about tenderization processes.

1. Introduction

Beef meat is a very important economic sector in some countries like USA, Australia, Brazil, and France [1]. Tenderness is the most appreciated organoleptic meat quality by consumers [2]. But this quality is characterized by an uncontrolled variability, which is a reason of consumer's insatisfaction. This variability depends on muscle, a complex and mosaic tissue, composed by different cell and extracellular matrix types.

Since decade, genomic research programs have identified some tenderness markers, at DNA [3], RNA [4] and proteins levels [5]. Heat Shock Proteins, metabolic enzymes, proteolysis enzymes, structural proteins, and contraction proteins were related with tenderness in previous studies. These markers are implied in a lot of different cellular mechanisms, like glycolysis, muscle contraction, stress reactions or cell cycle and apoptosis. So, these studies were not sufficient to bring an overview of the different cellular mechanisms implied in tenderness and their interactions.

The aim of this work was to identify the most important cellular pathways related with tenderness, defined by some protein tenderness markers, and to propose explanations about tenderization processes and their interactions in two different muscles. Appreciatively 33 % of tenderness variability could be explained by known biochemical markers, like collagen or lipids content [6]. Other genomic markers have been identified, so it could be interesting to study their relationship with tenderness and completed knowledge on tenderness markers.

To do this, we quantified 24 proteins previously identified as markers of tenderness, notably in French cattle (for review: [5]), and constructed an interactome from these proteins, based upon interaction databases. A functional analysis of all the interactome made identified pathways involved in tenderization process. We also compared the relationship of the 24 protein markers with tenderness for 2 muscles and analyzed the effect of muscle type on their abundance.

2. Materials and methods

2.1. Animals and samples

This study was conducted on 67 Charolais young bulls and 44 Charolais steers (castrated at 3 months of age) from the INRA programme MUGENE (ANR AGENAE-APISGENE). Slaughter age average was 17 months for bulls and 30 months for steers. All experimental procedure was approved by the INRA Animal Care Committee in accordance with the use of Vertebrate for Scientific Purposes Act 1985. Muscle samples from the *Longissimus thoracis* (LT, fast oxido-glycolytic in bovine [7, 8]) and *Semitendinosus* (ST, fast glycolytic in bovine [9]) muscles were excised for each animal within 15 minutes after slaughter. Muscle samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until protein extraction. Steaks for each muscle were matured at 4°C for 21 days, and then frozen at -20°C. After defrosting, they were cooked at an internal temperature of 55°C. In order to determine tenderness values, shear force measurement for each samples was done with a Warner-Braztler (WB) device [10]. Shear-force values correspond to meat toughness, opposite with tenderness. Shear force values of LT muscle ($39.5 \text{ N/cm}^2 \pm 0.90$) are lower than ST values ($58.8 \text{ N/cm}^2 \pm 1.42$), in agreement with the highest tenderness in LT previously reported in literature [11].

Total protein extractions were performed according to Bouley *et al.* [12] in a denaturation/extraction buffer (8.3M urea, 2M thiourea, 1% DTT, 2% CHAPS). All chemical reagents were from Sigma (St Louis, MO, USA). The protein concentration was determined by spectrophotometry with the Bradford assay [13]. Protein extractions were stored at -20°C until use.

2.2. Protein markers studied

The 24 proteins studied were identified as tenderness markers by the programme MUGENE [14] and others previous works [4, 5, 15, 16].

2.3. Immunological protein quantification

The conditions for use and specificity of primary antibodies (produced in mouse, rabbit or sheep) against the 24 proteins analyzed on bovine muscle were assessed according to the methodology described by Guillemain *et al.* [17]. Briefly, western blots were used in order to check the specificity of antibodies. An antibody was considered specific against the studied protein when one band at the expected molecular weight was detected by western blot. Conditions and suppliers for all primary antibodies are reported in Table 1.

Secondary fluorescent-conjugated IRDye 800CW antibodies, binding primary antibodies (anti-mouse, anti-sheep, anti-rabbit) were supplied by LI-COR Biosciences (Lincoln, Nebraska, USA) and used at 1/20000.

Protein quantifications with the validated antibodies were done by Dot blot, with the protocol exactly as described by Guillemain *et al.* [17]. Briefly, protein samples were spotted in quadruplicate on a nitrocellulose membrane with the Minifold I Dot blot from Schleicher&Schuell Biosciences (Germany) and hybridized with the specific antibody of the each protein, with conditions defined by western blot. Then membranes were scanned by the scanner Odyssey (LI-COR Biosciences) at 800 nm. Protein abundance for each sample, given in arbitrary units, was normalized according to the abundance of a mix of different samples, used as a reference.

2.4. Statistical analysis

To calculate an equation of tenderness prediction, linear regressions were done by the XLSTAT module (version 7.5.2) for LT and ST muscles independently. In linear regressions, WB measures constituted the dependant variable to explain and the abundances of the 24 proteins were the quantitative and explainable variables. An equation was done for each

muscle and attributes a coefficient for each protein. These coefficients were used to characterize the influence of each protein abundances on WB measures in LT and in ST.

Ratio of protein abundances for muscle effect was calculated between each protein means of LT versus ST.

2.5. Interactome

The interaction informations about the 24 proteins were provided by the Michigan molecular interactions (MiMI) database, providing informations from different databases [18]. Only the interactions demonstrated by experimental data were considered for interactome making. Human data were used, considering the poor rate of bovine knowledge on databases. For that, we previously converted the bovine gene name to human gene name and UniProtKB/Swiss-Prot accession numbers, checked by BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) between bovine protein sequence versus human (Table 2). To facilitate comprehension and information reconversion from human to bovine, proteins were considered by their gene name.

The interactome was done with the Cytoscape software (version 2.6.3) using the organic layout [19]. Functional annotations provided from the “Gene Association file for *Homo sapiens*”, and the ontology was the “Gene Ontology Full”. Descriptions of Gene Ontology (GO) terms were taken from the AmiGO website (<http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/go.cgi>). Function analyses and extractions from interactome were done with the plug-in BiNGO 2.3 [20]. This plug-in quantified the number of occurrence for each muscle-related function identified in the interactome. Number of occurrence percentage of each function was calculated from the number of occurrences of all interactome functions.

3. Results and Discussion

3.1 Interactome study

The first part of the work consisted to identify proteins that interact with the 24 markers according to information stored and shared in MiMI Database. Such interactions were then visualized on a graph using Cytoscape (Figure 1). Only two proteins were not linked with the interactome: MYBPH and MyHC-I. These proteins are well known by their function, so we can hypothesize that databases are not sufficient for these two proteins, concerning interactions with partners. The others 22 protein markers were linked in an interactome, at a first level (e.g. a marker is linked with an other marker by the intermediary of one protein maximum).

We can distinguish easily sub-networks that were organized around 4 proteins with a great number of interactants: CAPN1, HSPA1A, HSPA8, and HSPB1. Two others sub-networks can be distinguished: the metabolism network, constituted by most of the metabolic enzymes, and the structure network, constituted by most of the structural proteins.

3.1.1. CAPN1

The protein CAPN1 (μ -calpain) is a proteolytic enzyme calcium-dependant. This protein is involved in the post-mortem protein degradation in muscle [21]. CAPN1 is an important actor of the tenderization process [22]. The sub-network of CAPN1 was important, reflecting the high number of targets, like vimentin (VIM), collagen chains (COL1A1), or desmin (DES) [23]. The activity of CAPN1 is inhibited by the calpastatin (CAST).

The functional analysis of the CAPN1 network (Figure 2A) showed implications on developmental process (23 %), apoptosis and its regulation (19 %) cellular component organization and biogenesis (15 %), and response to external stimulus (10 %), for the most important functions detected.

3.1.2. HSPA1A and HSPA8

HSPA1A, the Hsp70-1A/B, and HSPA8, the Hsp70-8, belong to the family of Hsp70s, very important and highly conserved among organisms from *Escherichia coli* to *Homo sapiens* [24]. The two sub-networks were linked themselves and shared interactants. The functions of these two proteins are protein folding ATP-dependant, promoting cell survival by an anti-apoptotic activity, cell growing, protein import to mitochondria, and Reactive Oxygen Species (ROS) formation inhibition. The importance number of the two sub-networks' interactants reflects the great variety of the functions of these two proteins. Some proteins were linked to both HSPA1A and HSPA8. BAG1 bind to the proteins and promote cell survival [25]. HSF1, the Heat Shock Factor, is a transcriptional factor, binding to the HSPs genes on their promoter specific sequence, HSE (Heat Shock Element). After conversion from an inactive form to an active one by Hsp70s, HSF1 activates the expression of Hsp70s gene [26]. A high level of Hsp70s in the cell inhibits the HSF1 activity. HSPBP1 binds to HSF1 and HSP70s, and contribute to the downstream of HSF1 activity [27].

The functional analysis of HSPA1A (Figure 2B) showed that this protein is involved in a lot of cellular mechanisms, but especially in biopolymer metabolic process (15 %), apoptosis and regulation (14 %), nucleic acid metabolism process (11 %), protein metabolic process (11 %).

The functional analysis of HSPA8 (Figure 2C) showed that this protein is mainly implied in apoptosis and regulation (20 %), protein folding, response to chemical stimulus (13 %), response to stress (13 %), and regulation of developmental process (12 %).

3.1.3. HSPB1

HSPB1, the Hsp27, belongs to the Hsp20 family, with HSPB6 (Hsp20) and CRYAB (α -crystallin, chain B) [28]. The Hsp20s are implied in the protection of structural proteins like desmin (DES), actin (ACTA1) and titin [29, 30], and inhibits the formation of aggregates [31]. HSPB1 is also an anti-apoptotic factor, promoting cell survival by cytochrome C (CYCS) sequestration [32].

The functional analysis of HSPB1 network (Figure 2D) showed main functions in regulation of apoptosis (37 %), regulation of intracellular transport (14 %), regulation of translational initiation (14 %) and androgen signaling pathway (14 %).

The three HSPs networks (HSPA1A, HSPA8 and HSPB1) were linked together, as HSPA8 bind to CYCS to form an antiapoptotic complex [33]. These networks constituted the Heat Shock Proteins response in the cell. The main functions of these pathways were anti-apoptosis, stress response and chaperone activity.

3.1.4. Metabolism and structure

Most of the metabolic enzymes and structural proteins were respectively pooled in their own sub-network, not completely integrated in the interactome. The metabolism network was linked only with two proteins of the interactome: SUMO4 and H2AFX, with Lactate Dehydrogenase-B (LDHB) and Enolase-1 (ENO1). The structural network was linked with three proteins of the interactome: H2AFX, TP53 and CAPN1.

The interactome study showed that 3 proteins, H2AFX, SUMO4 and TP53, were very interesting nodes in the interactome, because there were at crossroads. These crossroads establish links between groups of proteins involved in tenderness, like metabolism, structure, and stress proteins. Results obtained by prediction equation showed that the 24 markers studied explain 25 to 40 % of tenderness variability. So it was important to identify potential

markers to study. These 3 proteins, by their position in tenderness interactome, were interesting candidates for tenderness.

3.1.5. SUMO4

SUMO4 (UniProtKB/Swiss-Prot: Q6EEV6) is the small ubiquitin-like modifier 4, doing the sumoylation on protein targets [34]. Sumoylation regulates functions on proteins implicated in signal transduction, transcription, DNA protection, protein targeting, cell cycle, and glucose metabolism. Sumoylation is also a protective pathway against stress, preventing degradation. A lot of SUMO4 substrates are stress, structure and metabolic proteins. So, this is concordant with the place of SUMO4 in the interactome, first linked to HSPA1A, HSPA8 and DNAJA1, three stress proteins, and second linked to LDHB, ENO1 and PRDX6, three enzymes. Our hypothesis is that SUMO4 could be a potential marker for tenderness pertinent for further analyses, as this protein is involved in stress protein recruitment by sumoylation processes. This protein could be an essential actor in the stress pathway implied in tenderization process.

3.1.6. H2AFX

H2AFX (UniProtKB/Swiss-Prot: P16104) is an histone, involved in the cellular response to DNA damages, notably during oxidative stress [35]. This protein is linked to many different types of proteins involved in: DNA reparation, cell cycle, apoptosis, oxidative stress, metabolism and calcium signalling. During stresses, H2AFX recruits metabolism enzymes to activate energy generation, enhance protein synthesis, and recruit anti-stress proteins, like HSPA1A, to protect cells from degradation. H2AFX modulates different pathways, and so is an interesting protein to study for tenderness. As H2AFX recruit stress proteins during oxidative stress, this protein could play a central role in stress pathways implied in tenderization processes.

3.1.7. TP53

TP53 (UniProtKB/Swiss-Prot: P04637) is a transcription factor. Its function is to stop the cell cycle and to promote apoptosis [36]. This factor is inactivated by a sequestration with HSPA9. TP53 downstreams HSP genes expression by binding on their promoters. When the expression of Hsp27 and Hsp70 is high, the expression of TP53 is low [37]. S100A4 modifies the phosphorylation status of TP53, and activates the expression of genes under TP53 control. This leads to apoptosis. TP53 bind to F-actin (ACTA1) to anchor in the nuclear matrix [38]. The association of TP53 with ACTA1 is modulated by DNA damages. HSPA1A bind to the stress-altered form of TP53 [39]. TP53 is also one of the CAPN1 target [40]. So, the factor TP53 is linked and implied with others sub-network in interactome. TP53 could be an important marker for beef tenderness.

3.2. Biological functions of tenderness

The second part of this work consisted to analyze the biological functions of all the proteins present in the interactome previously obtained and presented in Figure 1, in muscular cells. The Gene Ontology analyzed the overall interactome (330 proteins) and provided a high number of cellular functions. For each functions, the function's occurrence in interactome was expressed in percentage of all the occurrences identified by Gene Ontology in interactome (Figure 3). Functions retained were actin filament-based process (4 %), androgen receptor signaling pathway (1 %), apoptosis (8 %), barbed-end actin filament capping (1 %), cellular component organization and biogenesis (13 %), cytoskeleton organization and biogenesis (5 %), developmental process (17 %), glucose metabolic process (4 %), intracellular signaling cascade (9 %), muscle contraction (3 %), protein folding (5 %), regulation of apoptosis (8 %),

regulation of developmental process (9 %), regulation of intracellular transport (1 %), and response to stress (12 %).

This analyze showed the importance of the apoptosis, represented by the GO function “apoptosis” and “regulation of apoptosis”, which represent 16 % of the overall occurrences of the interactome GO functions. Apoptosis is a cell death program, involved in tenderness by Ouali et al. [41]. Apoptosis enhance the tenderness by initiating cellular proteolysis during the early stage of tenderization, just after slaughtering. This mechanism is associated with the destruction of cytoskeleton, done by caspases. So, this analyze underline the importance of apoptosis in tenderness and confirms the work of Ouali et al. [41].

The developmental process and its regulation had an important role in tenderness (25 %). The mechanism is defined as the biological process whose specific outcome is the progression of a multicellular organism over time from an initial condition (e.g. a zygote, or a young adult) to a later condition (e.g. a multicellular animal or an aged adult). Some studies pointed the influence of proteins involved in muscle development with tenderness [42]. This is consistent with the importance of the developmental process with tenderness.

The response to stress has a high number of occurrences in tenderness interactome (12 %). This mechanism is defined as a change in state or activity of a cell or an organism (in terms of movement, secretion, enzyme production, gene expression, etc.) as a result of a disturbance in organism or cellular homeostasis, usually, but not necessarily, exogenous (e.g. temperature, humidity, ionizing radiation). It is well known that stress is an exogenous factor during animal life that influences meat quality [43].

The cellular component organization and biogenesis was also important for tenderness (13 %). This mechanism is defined as a process that is carried out at the cellular level which results in the assembly, arrangement of constituent parts, or disassembly of a cellular component. This is concomitant with the role of cell integrity in tenderness.

This functional analysis showed that the muscle contraction and the glucose metabolic process have a poor number of occurrences in tenderness interactome (3 and 4 % respectively). This could explain why it is difficult to clearly establish relationships between metabolism and fibre type with tenderness [44].

The second part of this work provided an overview of tenderness, as an assembly of different biological and cellular pathways. It underlines the importance of some mechanisms (apoptosis, development, stress) and the minor roles of others (glucose metabolism, muscle contraction). This allowed us to propose a simple and functional interactome in muscle, to explain proteins and pathways relationships with tenderness (Figure 4).

The stress plays an important role by recruiting SUMO4, H2AFX, and HSPs, and engages the cells in some specific pathways: anti-apoptosis, chaperone activity and DNA protection. These pathways allowed the cell to survive under stress conditions, notably by maintaining functions of metabolism and structural proteins. These cellular functions are much linked, and the stress appears to be the common factor of these different pathways. Moreover, the same proteins are also involved in developmental processes and cellular component organization.

3.3. Integration of experimental data

The third part of the work consisted in conjugate quantifications data on 24 markers and the functional interactome, to precisely analyze what functions were involved in tenderness, in LT and ST muscles respectively. More exactly, the coefficient of the 24 markers in the tenderness equation (Table 3) was replaced in the interactome to highlight important functions for tenderness. This coefficient was related with shear-force, and so meat toughness. So, a protein with a positive coefficient was related with a decreased tenderness.

3.3.1. LT muscle

The LT-muscle tenderness interactome is the Figure 5. The proteolysis (CAPN1 and CAPN2) were positively correlated with tenderness. This is in accordance with the central dogma of a significant importance of proteolytic system with tenderness [45]. This fact is concordant with the positive relationship between the anti-apoptosis protein HSPB1 and tenderness. The two proteins HSPB1 and CRYAB are implied in protein protection against aggregation, which is an inhibitor of proteolysis. HSPB1 is involved in actin protection, whereas CRYAB is involved in desmin protection. We can hypothesize that desmin and actin protection is a positive factor in tenderization process by inhibiting formation of aggregates and so favoring proteolysis. The protein HSPB6 was negatively correlated with tenderness, contrary to proteins of the same family, HSPB1 and CRYAB. This can be due to a more specific role of HSPB6 on tenderness. The structural proteins (DES, CAPZB, MYH2, MYH1) were positively correlated with tenderness, compatible with the positive correlation with tenderness of the structural protein protection by HSPB1 and CRYAB. Two regulatory fast twitch myosins (MYBPH and MYL1) were negatively correlated with tenderness, as the slow contractile type (MYH7). The two fast twitch heavy chain of myosins, MYH1 and MYH2, were positively correlated with tenderness. This is in contradiction with the negative role of MYBPH and MLC-1F, as these proteins were involved in the fast twitch, and in opposition with MYH7, the slow twitch myosin. Reasons of contradiction between fast twitch myosins and between myosin heavy chains were unknown. Slow contractile apparatus is associated with oxidative metabolism, so anti-oxidative enzymes (PARK7, PRDX6, SOD1) have a negative contribution to tenderness. This is compatible with the importance of heat shock proteins HSPB1 and CRYAB in protein protection. HSPA1A and HSPA8, chaperone proteins, were respectively positively and negatively correlated with tenderness. Their specificity in term of protein partners and interaction could explain this difference. The HSPA1A network was positive for tenderness, whereas the HSPA8 network was negative. We could hypothesize that these proteins are involved in too many processes to be clearly associated with a negative or positive effect on tenderness. Two others heat shock proteins, HSPA9 and DNAJA1 were strongly positively correlated with tenderness. We can hypothesize that these proteins' functions are in the same way that HSPB1 and CRYAB functions to protect proteins. Contribution of metabolic enzymes is complex. The protein ENO3, a glycolytic enzyme, was negatively correlated with tenderness. But others glycolytic enzymes, PGM, LDHB and Enol, had no influence on tenderness. At the opposite, the oxidative enzyme, MDH1, was positively correlated with tenderness. These data are mostly in agreement with the previous observations of the positive and negative correlations of oxidative and glycolytic enzymes with tenderness [6, 46]. Tenderness in LT muscle could be influenced essentially by three pathways: an upstream of structural proteins protection and proteolysis, and a downstream of oxidative stress defense proteins.

3.3.2. ST muscle

The ST-muscle tenderness interactome is the Figure 6. The proteolysis contribution to tenderness was more difficult to analyze, because there was a positive correlation with tenderness of CAPN1, opposite to a negative correlation of CAPN2. We can hypothesize that proteolysis of CAPN1-targets is positively related to tenderness, contrary to CAPN2-targets proteolysis. HSPA1A and HSPA9 were strongly negatively correlated with tenderness, and HSPA8 had no correlation. We can hypothesize that HSPA1A and HSPA9 networks are related with tenderness, contrary to HSPA8 network. Correlations of DNAJA1 and SOD1 with tenderness were positive. As DNAJA1 is implied in mitochondria protein import, notably for SOD1, we can hypothesize that SOD1 activity and integrity is critical for tenderness in ST muscle. This pathway could be related to oxidative stress, more aggressive

in a glycolytic muscle like ST, unprepared to this stress. But the two others proteins implied in oxidative stress, PRDX6 and PARK7, had a negative correlation with tenderness. This could reflect a strong specificity of the oxidative stress contribution. Activity of SOD1 (destruction of oxygen free radicals) was positively correlated with tenderness, whereas activities of PRDX6 (destruction of dihydrogen peroxide) and PARK7 (oxidative stress sensor) were negatively correlated. Correlation with tenderness of structural proteins was different among them. DES was positively correlated with tenderness, in accordance with the positive correlation of CRYAB, a desmin-protecting protein [47]. We could hypothesize that in ST muscle, the costamere structure integrity (DES) is positively implied in tenderness. Correlations of the fast twitch myosins, MYH2 and MYH1, were opposites. So, the correlation with tenderness of myosins, MYH1, MYH2 and MYH7, was not clear in ST muscle. This type of results was also observed for MYBPH opposite to MYL1. Correlation of CAPZB was very low. The correlation of metabolic enzymes was also not clear. LDHB and ENO3, glycolytic enzymes, were positively correlated with tenderness. This is opposite with the negative correlation with tenderness of ENO1 and PGM1, glycolytic enzymes too. Correlation of MDH1 was low. Tenderness in ST muscle could be influenced essentially by structural protein protection and notably costamere integrity, CAPN1 proteolysis, and HSPA1A and HSPA9 functions.

3.3.3. Comparisons between LT and ST muscle

3.3.3.1. Common to the 2 muscles

The positive correlation of CAPN1 with tenderness was common between ST and LT, which shows the importance of this protein activity in tenderization for the two muscles.

DES and the desmin-protecting HSP, CRYAB were positively correlated with tenderness in the two muscles, which shows that the costamere integrity is important for tenderness.

The proteins PRDX6 and PARK7, involved in oxidative stress resistance, were negatively correlated with tenderness in two muscles and confirm that oxidative stress is important in tenderization processes.

Correlation with tenderness of the proteins MYH2, MYL1 and MYBPH showed no difference between the two muscles

3.3.3.2. Muscle specific

At the opposite of CAPN1, the abundance of CAPN2 was positively correlated with tenderness in LT and negatively in ST. This difference in CAPN2 effect in tenderization between the two muscles is curious. We could hypothesize that CAPN1 proteolysis is always positively correlated with tenderness among muscles, because proteins processed by CAPN1 are negatively correlated with tenderness. At the opposite, CAPN2-proteolysis could be positively correlated with tenderness in LT muscle and negatively in ST-muscle, due to the opposite relationship between CAPN2-targets with tenderness.

The proteins HSPA1A, HSPA9 and HSPA8 had opposite correlations with tenderness. HSPA9 and HSPA1A were positively correlated with tenderness in LT and negatively in ST. HSPA8 was also negatively correlated with tenderness in LT but not in ST. As for CAPN1 and CAPN2, the sub-networks associate with these proteins could explain differences in tenderization processes between the two muscles.

Interestingly, the correlation with tenderness of the metabolic enzymes (ENO1, ENO3, LDHB, PGM1, MDH1) was reversed between LT (oxydo-glycolytic) and ST (glycolytic). This could reflect differences of the metabolic pathways between LT and ST in tenderization process.

The correlation with tenderness of the two myosin heavy chains MyHC-I (MYH7) and MyHC-IIx (MYH1), respectively the heavy chains of slow-twitch and fast-twitch, was

specific of muscle contraction type. Correlation with tenderness of the fast-twitch myosin heavy chain was positive in fast-twitch muscles, and negative in slow-twitch muscles. Correlation with tenderness of the slow-twitch myosin heavy chain was positive in slow-twitch muscles, and negative in fast-twitch muscles. These results are in accordance with works of Picard *et al* [16] and Guillemain *et al* [48].

So, the comparison of the two muscles shows common pathways involved in tenderization process between the two muscles: oxidative stress resistance, CAPN1 proteolysis and costamere integrity. Role in tenderness of some pathways is muscle specific: CAPN2 proteolysis, Hsp70 family activities, energy metabolism and heavy myosins. This third part of the work demonstrated that tenderization processes are not homogenous and depend on biological factors, such as muscle type.

3.4. Muscle type effect on protein expression

It is well known that muscle type affects the expression patterns of some proteins [49]. In this part, we will focus on the effect on sub-networks and associated functions (Figure 7). For each protein, we illustrated the ratio of the abundance between LT and ST (Table 4).

The network constituted by HSPB1, HSPB6, and CRYAB, and the other constituted by DNAJA1, HSPA8 and HSPA1A were more expressed in LT muscle. We could hypothesize according to proteins functions, that chaperone, anti-apoptotic and anti-stress functions are more active in LT muscle. This is concordant with the oxidative status of LT muscle, affirmed by expression of MYH7, the slow twitch myosin. This is confirmed by the previous work of Guillemain *et al* [49] which demonstrate a higher abundance of stress-related proteins (HSPB1, HSPB6, CRYAB, DNAJA1, HSPA8, HSPA1A) in LT muscle than in ST muscle

ST muscle is characterized by a higher expression of PRDX6. We could hypothesize that, as the chaperone and anti-stress activities are lower in ST, PRDX6 reduces the oxidative injuries on proteins unprotected by heat shock proteins. MYH1 and MYH2, the fast twitch myosins, are also more expressed in ST, concordant with the nature of this muscle.

There are no differences between the muscles concerning the proteolytic system (CAPN1 and CAPN2). In the same way, differences for non-myosin structural proteins (CAPZB and DES) are very low. Except for ENO1, more expressed in ST, and PGM1, more expressed in LT, there are no differences between the two muscles.

4. Conclusions

This work replaced some tenderness markers in a global cellular context. This allowed generating an overview of tenderness, as an assembly of different pathways. Knowledge of these pathways is important to researches for new tenderness markers. In this work, three proteins, never studied in tenderness, appeared to be interesting to analyze: SUMO4, H2AFX and TP53. These proteins are at crossroad of the tenderness interactome, and are characterized by some regulating functions. These proteins could be responsible of balance between pathways, like apoptosis or stress responses. So, studying their relationship with tenderness, by the same techniques as the 24 markers, could complete knowledge on tenderness markers, and contribute to more explain tenderness variability.

This work identified cellular pathways strongly involved in tenderization processes: apoptosis, HSP functions and oxidative stress resistance. We also demonstrated that the role of these pathways on tenderization process is different between muscle types.

This type of functional interactome is so useful to better understand tenderness, a complex association of different cellular processes. In a next future, we can complete this analysis by adding others tenderness markers, to generate a complete map of tenderness markers in the cellular pathways.

Acknowledgments

The PhD grant of N. Guillemin is provided by INRA and the regional council of Auvergne in France. This work was funded by the National Agency of Research (ANR) and APIS-GENE for the MUGENE programme (through the AGENAE/GENAIMAL call). The authors wish to thank Christiane Barboiron for her skilled technical assistance, Jacques Lepetit (†) for Warner-Bratzler measurements, Gilles Renand for MUGENE conception, Jean-François Hocquette for MUGENE management and the INRA experimental farms of Bourges and Le Pin aux Haras for animal breeding and the INRA of Clermont-Ferrand experimental slaughterhouse for animal slaughtering and muscle sampling.

The authors declared no conflict of interest.

463 **Table 1** Suppliers and conditions for each primary antibody used in this study

Target protein	Antibody references	Dillution
Heat Shock Proteins		
α B-crystallin	Monoclonal anti-bovine Assay Designs SPA-222	1/500
Hsp20	Monoclonal anti-human Santa Cruz HSP20-11:sc51955	1/200
Hsp27	Monoclonal anti-human Santa Cruz HSP27 (F-4):sc13132	1/3000
Hsp40	Monoclonal anti-human Santa Cruz HSP40-4 (SPM251):sc-56400	1/250
Hsp70-1A	Monoclonal anti-human Abnova HSPA1B (M02), clone 3B7	1/2000
Hsp70-8	Monoclonal anti-bovine Santa Cruz HSC70 (BRM22):sc-59572	1/250
Hsp70/GRP75	Monoclonal anti-human RD Systems Clone 419612	1/250
Metabolism		
Eno1	Polyclonal anti-human Acris BP087	1/2000
Eno3	Monoclonal anti-human Abnova Eno3 (M01), clone 5D1	1/45000
LDHB	Monoclonal anti-human Novus LDHB NB110-57160	1/50000
MDH1	Monoclonal anti-pig Rockland 100-601-145	1/1000
PGM1	Monoclonal anti-human Abnova PGM1 (M01), clone 3B8-H4	1/8000
Structure		
CapZ- β	Monoclonal anti-human Abnova CAPZB (M03), clone 4H8	1/250
Desmin	Monoclonal anti-human DAKO clone D33, M0760	1/250
MLC-1F	Polyclonal anti-human Abnova MYL1 (A01)	1/1000
MyBP-H	Monoclonal anti-human Abnova MYBPH (M01), clone 1F11	1/4000
MyHC-I	Monoclonal anti-human Biocytex 5B9	1/2000
MyHC-II	Monoclonal anti-human Biocytex 15F4	1/4000
MyHC-IIx	Monoclonal anti-human Biocytex 8F4	1/500
Oxidative resistance		
DJ-1	Polyclonal anti-human Santa Cruz DJ-1 (FL-189):sc-32874	1/250
PRDX6	Monoclonal anti-human Abnova PRDX6 (M01), clone 3A10-2A11	1/500
SOD1	Polyclonal anti-rat Acris SOD1 APO3021PU-N	1/1000
Proteolysis		
M-calpain	Monoclonal anti-bovine ABR M-calpain MA3-942	1/1000
μ -calpain	Monoclonal anti-bovine Alexis μ -calpain 9A4H8D3	1/1000

464
465
466
467
468
469
470
471

Table 2. Protein names, gene names and references in Homo sapiens for the markers studied

Protein	Gene	UniProtKB/Swiss-Prot	Reference
CapZ β	CAPZB	P47756	[50]
Cis-Peroxisredoxin	PRDX6	P30041	[51]
Crystallin α Chain B	CRYAB	P02511	[28]
Desmin	DES	P17661	[52]
DJ-1	PARK7	Q99497	[53]
Enolase 1	ENO1	P06733	[54]
Enolase 3	ENO3	P13929	[54]
Hsp20	HSPB6	O14558	[28]
Hsp27	HSPB1	P04792	[28]
Hsp40	DNAJA1	P31689	[24]
Hsp70-1A/B	HSPA1B	P08107	[24]
Hsp70-8	HSPA8	P11142	[24]
Hsp70-Grp75	HSPA9	P38646	[24]
Lactate Dehydrogenase Chain B	LDHB	P07195	[54]
Malate Dehydrogenase 1	MDH1	P40925	[54]
M-calpain	CAPN2	P17655	[21]
Mu-calpain	CAPN1	P07384	[21]
Myosin Binding Protein H	MYPBH	Q13203	[50]
Myosin Heavy Chain I (slow)	MYH7	P12883	[55]
Myosin Heavy Chain IIa (fast)	MYH2	Q9UKX2	[55]
Myosin Heavy Chain IIx (fast)	MYH1	P12882	[55]
Myosin Light Chain 1F	MYL1	P05976	[56]
Phosphoglucomutase	PGM1	P36871	[57]
Super-oxide Dismutase Cu/Zn	SOD1	P00441	[58]

476

Table 3. Prediction equation coefficient and P-value of proteins for each muscle

Protein (considered by their gene name)	LT	ST
CAPZB	-0.27 (P > 0.1)	0.05 (P > 0.1)
PRDX6	1.12 (P = 0.001)	2.09 (P < 0.001)
CRYAB	-0.35 (P < 0.05)	-0.59 (P < 0.1)
DES	-0.52 (P < 0.05)	-0.61 (P > 0.1)
PARK7	0.59 (P > 0.1)	0.62 (P > 0.1)
ENO1	-0.15 (P > 0.1)	0.98 (P < 0.1)
ENO3	1.02 (P < 0.05)	-0.42 (P > 0.1)
HSPB6	0.97 (P < 0.001)	-0.19 (P > 0.1)
HSPB1	-0.25 (P > 0.1)	-0.05 (P > 0.1)
DNAJA1	-0.68 (P < 0.1)	-1.34 (P < 0.05)
HSPA1B	-0.22 (P > 0.1)	1.62 (P = 0.001)
HSPA8	0.44 (P > 0.1)	0.01 (P > 0.1)
HSPA9	-0.74 (P < 0.05)	1.54 (P < 0.05)
LDHB	-0.12 (P > 0.1)	-1.76 (P < 0.001)
MDH1	-0.48 (P > 0.1)	0.17 (P > 0.1)
CAPN2	-0.32 (P > 0.1)	0.68 (P > 0.1)
CAPN1	-0.54 (P > 0.1)	-1.03 (P < 0.1)
MYPBH	0.62 (P < 0.001)	0.29 (P > 0.1)
MYH7	0.62 (P < 0.05)	-0.54 (P > 0.1)
MYH2	-0.47 (P > 0.1)	-0.28 (P > 0.1)
MYH1	-0.34 (P < 0.01)	0.33 (P < 0.01)
MYL1	0.05 (P > 0.1)	-0.15 (P > 0.1)
PGM1	0.03 (P > 0.1)	0.80 (P > 0.1)
SOD1	0.06 (P > 0.1)	-0.76 (P > 0.1)

477

478

479

480

481

1

¹ Prediction equations in LT and ST muscles explain respectively 69 % and 86 % of tenderness variability. To facilitate comprehension, proteins were considered by their gene name. Proteins with a significant contribution in prediction equation are in bold.

482

Table 4. *Protein means and ratio between the two muscles LT and ST*

Protein (considered by their gene name)	LT		ST		Ratio
	Mean	SE	Mean	SE	
CAPZB	15.1	0.24	15.2	0.25	0.98
PRDX6	15.8	0.25	16.4	0.32	0.96
CRYAB	20.9	0.77	10.5	0.48	2.04
DES	14.5	0.29	14.3	0.24	1.03
PARK7	15.5	0.19	15.1	0.24	1.02
ENO1	13.6	0.25	15.2	0.30	0.89
ENO3	14.7	0.23	14.1	0.24	1.04
HSPB6	18.3	0.46	11.4	0.25	1.60
HSPB1	13.7	0.56	13.0	0.59	1.07
DNAJA1	15.8	0.24	13.1	0.27	1.21
HSPA1B	15.9	0.43	10.8	0.27	1.50
HSPA8	15.9	0.23	14.2	0.24	1.11
HSPA9	15.0	0.26	14.5	0.27	1.03
LDHB	15.1	0.37	14.7	0.36	1.03
MDH1	15.6	0.22	15.8	0.25	0.99
CAPN2	14.2	0.24	14.0	0.25	1.01
CAPN1	15.3	0.19	14.9	0.27	1.02
MYPBH	16.5	0.50	13.6	0.47	1.23
MYH7	16.2	0.23	14.3	0.32	1.14
MYH2	14.5	0.17	15.8	0.23	0.92
MYH1	9.7	0.58	21.6	0.87	0.45
MYL1	14.1	0.27	14.3	0.28	0.98
PGM1	14.6	0.24	13.1	0.25	1.10
SOD1	15.3	0.41	15.0	0.54	1.03

483

484

485 2

486

² To facilitate comprehension, proteins were considered by their gene name.

References

- [1] Veysset P, Bebin D, Lherm M. Adaptation to Agenda 2000 (CAP reform) and optimisation of the farming system of French suckler cattle farms in the Charolais area: a model-based study. *Agric Sys.* 2005;83:179-202.
- [2] Geay Y, Bauchart D, Hocquette JF, Culioli J. Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. *Reprod Nutr Dev.* 2001;41:1-26. Erratum, 41, 377.
- [3] Hocquette JF, Lehnert SA, Barendse W, Cassar-Malek I, Picard B. Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. *Animal.* 2007;1:159-73.
- [4] Bernard C, Cassar-Malek I, LeCunff M, Dubroeucq H, Renand G, Hocquette JF. New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. *J Agric Food Chem.* 2007;55:5229-37.
- [5] Picard B, Berri C, Lefaucheur L, Molette C, Sayd T, Terlouw C. Skeletal muscle proteomics in livestock production. *Briefings in Functional Genomics.* 2010;9:259-78.
- [6] Maltin C, Balcerzak D, Tilley R, Delday M. Determinants of meat quality: tenderness. *Proc Nutr Soc.* 2003;62:337-47.
- [7] Jurie C, Robelin J, Picard B, Renand G, Geay Y. Inter-Animal Variation in the Biological Characteristics of Muscle-Tissue in Male Limousin Cattle. *Meat Sci.* 1995;39:415-25.
- [8] Jurie C, Picard B, Hocquette JF, Dransfield E, Micol D, Listrat A. Muscle and meat quality characteristics of Holstein and Salers cull cows. *Meat Sci.* 2007;77:459-66.
- [9] Schreurs NM, Garcia F, Jurie C, Agabriel J, Micol D, Bauchart D, et al. Meta-analysis of the effect of animal maturity on muscle characteristics in different muscles, breeds, and sexes of cattle. *J Anim Sci.* 2008;86:2872-87.
- [10] Wheeler TL, Shackelford SD, Johnson LP, Miller MF, Miller RK, Koohmaraie M. A comparison of Warner-Bratzler shear force assessment within and among institutions. *J Anim Sci.* 1997;75:2423-32.
- [11] Renand G, Picard B, Touraille C, Berge P, Lepetit J. Relationships between muscle characteristics and meat quality traits of young Charolais bulls. *Meat Sci.* 2001;59:49-60.
- [12] Bouley J, Chambon C, Picard B. Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics.* 2004;4:1811-24.
- [13] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
- [14] Hocquette JF, Bernard C, Cassar-Malek I, Lepetit J, Micol D, Jurie C, et al. Mise en évidence de marqueurs de tendreté de la viande bovine par des approches de génomique fonctionnelle (projet MUGENE). 3R. Paris2007.
- [15] Morzel M, Terlouw C, Chambon C, Micol D, Picard B. Muscle proteome and meat eating qualities of Longissimus thoracis of "Blonde d'Aquitaine" young bulls: A central role of HSP27 isoforms. *Meat Sci.* 2008;78:297-304.
- [16] Picard B, Jurie C, Bauchart D, Dransfield E, Ouali A, Martin JF, et al. Caractéristiques des muscles et de la viande des principales races bovines allaitantes du Massif Central. *Sci Aliments.* 2007;27/2:168-80.
- [17] Guillemin N, Meunier B, Jurie C, Cassar-Malek I, Hocquette JF, Levéziel H, et al. Validation of a Dot-Blot quantitative technique for large-scale analysis of beef tenderness biomarkers. *J Physiol Pharmacol.* 2009;60:91-7.
- [18] Tarcea VG, Weymouth T, Ade A, Bookvich A, Gao J, Mahavisno V, et al. Michigan molecular interactions r2: from interacting proteins to pathways. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:D642-D6.
- [19] Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003;13:2498-504.

- 537 [20] Maere S, Heymans K, Kuiper M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess
538 overrepresentation of Gene Ontology categories in Biological Networks. *Bioinformatics*.
539 2005;21:3448-9.
- 540 [21] Koohmaraie M, Whipple G, Kretchmar DH, Crouse JD, Mersmann HJ. Postmortem
541 proteolysis in longissimus muscle from beef, lamb and pork carcasses. *J Anim Sci*.
542 1991;69:617-24.
- 543 [22] Geesink GH, Kuchay S, Chishti AH, Koohmaraie M. μ -Calpain is essential for
544 postmortem proteolysis of muscle proteins. *J Anim Sci*. 2006;84:2834-40.
- 545 [23] Jiang LQ, Wen SJ, Wang HY, Chen LY. Screening the proteins that interact with calpain
546 in a human heart cDNA library using a yeast two-hybrid system. *Hypertens Res*.
547 2002;25:647-52.
- 548 [24] Fink AL. Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev*. 1999;79:425-49.
- 549 [25] Takayama S, Bimston DN, Matsuzawa S, Freeman BC, AimeSempe C, Xie ZH, et al.
550 BAG-1 modulates the chaperone activity of Hsp70/Hsc70. *EMBO J*. 1997;16:4887-96.
- 551 [26] Abravaya K, Myers MP, Murphy SP, Morimoto RI. The Human Heat-Shock Protein
552 Hsp70 Interacts with Hsf, the Transcription Factor That Regulates Heat-Shock Gene-
553 Expression. *Genes Dev*. 1992;6:1153-64.
- 554 [27] Satyal SH, Chen DY, Fox SG, Kramer JM, Morimoto RI. Negative regulation of the heat
555 shock transcriptional response by HSBP1. *Genes Dev*. 1998;12:1962-74.
- 556 [28] Sun Y, MacRae TH. Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone
557 function. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62:2460-76.
- 558 [29] Bullard B, Ferguson C, Minajeva A, Leake MC, Gautel M, Labeit D, et al. Association
559 of the Chaperone { α }B-crystallin with Titin in Heart Muscle. *J Biol Chem*.
560 2004;279:7917-24.
- 561 [30] Ghosh JG, Houck SA, Clark JI. Interactive sequences in the stress protein and molecular
562 chaperone human [α]B crystallin recognize and modulate the assembly of filaments. *The*
563 *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007;39:1804-15.
- 564 [31] Melkani GC, Cammarato A, Bernstein SI. [α]B-Crystallin Maintains Skeletal Muscle
565 Myosin Enzymatic Activity and Prevents its Aggregation under Heat-shock Stress. *J Mol*
566 *Biol*. 2006;358:635-45.
- 567 [32] Paul C, Manero F, Gonin S, Kretz-Remy C, Viot S, Arrigo AP. Hsp27 as a negative
568 regulator of cytochrome c release. *Mol Cell Biol*. 2002;22:816-34.
- 569 [33] Gao BC, Eisenberg E, Greene L. Effect of constitutive 70-kDa heat shock protein
570 polymerization on its interaction with protein substrate. *J Biol Chem*. 1996;271:16792-7.
- 571 [34] Guo D, Han J, Adam B-L, Colburn NH, Wang M-H, Dong Z, et al. Proteomic analysis of
572 SUMO4 substrates in HEK293 cells under serum starvation-induced stress. *Biochem Biophys*
573 *Res Commun*. 2005;337:1308-18.
- 574 [35] Yang XL, Zou P, Yao J, Yun D, Bao HM, Du RY, et al. Proteomic Dissection of Cell
575 Type-Specific H2AX-Interacting Protein Complex Associated with Hepatocellular
576 Carcinoma. *J Proteome Res*. 2010;9:1402-15.
- 577 [36] Grigorian M, Andresen S, Tulchinsky E, Kriajevska M, Carlberg C, Kruse C, et al.
578 Tumor suppressor p53 protein is a new target for the metastasis-associated Mts1/S100A4
579 protein - Functional consequences of their interaction. *J Biol Chem*. 2001;276:22699-708.
- 580 [37] Sun Y, Yi H, Zhang PF, Li MY, Li C, Li F, et al. Identification of differential proteins in
581 nasopharyngeal carcinoma cells with p53 silence by proteome analysis. *FEBS Lett*.
582 2007;581:131-9.
- 583 [38] Okorokov AL, Rubbi CP, Metcalfe S, Milner J. The interaction of p53 with the nuclear
584 matrix is mediated by F-actin and modulated by DNA damage. *Oncogene*. 2002;21:356-67.
- 585 [39] Kaur J, Srivastava A, Ralhan R. p53-HSP70 complexes in oral dysplasia and cancer:
586 potential prognostic implications. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1996;32B:45-9.

- [40] Jabbur JR, Zhang W. p53 antiproliferative function is enhanced by aspartate substitution at threonine 18 and serine 20. *Cancer Biol Ther.* 2002;1:277-83.
- [41] Ouali A, Herrera-Mendez CH, Coulis G, Becila S, Boudjellal A, Aubry L, et al. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Sci.* 2006;74:44-58.
- [42] Koohmaraie M, Kent MP, Shackelford SD, Veiseth E, Wheeler TL. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? *Meat Sci.* 2002;62:345-52.
- [43] Jelenikova J, Pipek P, Staruch L. The influence of ante-mortem treatment on relationship between pH and tenderness of beef. *Meat Sci.* 2008;80:870-4.
- [44] Guillemin N, Cassar-Malek I, Hocquette JF, Jurie C, Micol D, Listrat A, et al. La maîtrise de la tendreté de la viande bovine : identification de marqueurs biologiques. *INRA Prod Anim.* 2009;22:331-44.
- [45] Koohmaraie M, Geesink GH. Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Sci.* 2006;74:34-43.
- [46] Dransfield E, Martin JF, Bauchart D, Abouelkaram S, Lepetit J, Culioli J, et al. Meat quality and composition of three muscles from French cull cows and young bulls. *Anim Sci.* 2003;76:387-99.
- [47] Golenhofen N, Perng MD, Quinlan RA, Drenckhahn D. Comparison of the small heat shock proteins alpha B-crystallin, MKBP, HSP25, HSP20, and cvHSP in heart and skeletal muscle. *Histochem Cell Biol.* 2004;122:415-25.
- [48] Guillemin N, Jurie C, Renand G, Hocquette JF, Micol D, Lepetit J, et al. Tenderness phenotypic and proteomic markers. *J Anim Sci.* 2010;Accepted.
- [49] Guillemin N, Jurie C, Cassar-Malek I, Hocquette JF, Renan G, Picard B. Variations in the abundance of 24 proteins biomarkers of beef tenderness according to muscle and animal type. *Animal.* 2010;In Press.
- [50] Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC. Striated muscle cytoarchitecture: An intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2002;18:637-706.
- [51] Wang X, Phelan SA, Forsman-Semb K, Taylor EF, Petros C, Brown A, et al. Mice with targeted mutation of peroxiredoxin 6 develop normally but are susceptible to oxidative stress. *J Biol Chem.* 2003;278:25179-90.
- [52] Paulin D, Li ZL. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Exp Cell Res.* 2004;301:1-7.
- [53] Junn E, Taniguchi H, Jeong BS, Zhao X, Ichijo H, Mouradian MM. Interaction of DJ-1 with Daxx inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 activity and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:9691-6.
- [54] Hocquette JF, Ortigues-Marty I, Damon M, Herpin P, Geay Y. Métabolisme énergétique des muscles squelettiques chez les animaux producteurs de viande. *Productions Animales.* 2000;13:185-200.
- [55] Picard B, Barboiron C, Duris MP, Gagniere H, Jurie C, Geay Y. Electrophoretic separation of bovine muscle myosin heavy chain isoforms. *Meat Sci.* 1999;53:1-7.
- [56] Choi YM, Kim BC. Muscle fiber characteristics, myofibrillar protein isoforms, and meat quality. *Livestock Science.* 2009;122:105-18.
- [57] Landar A, Caddell G, Chessher J, Zimmer DB. Identification of an S100A1/S100B target protein: phosphoglucomutase. *Cell Calcium.* 1996;20:279-85.
- [58] Moradas-Ferreira P, Costa V, Piper P, Mager W. The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Mol Microbiol.* 1996;19:651-8.

Figures caption

Figure 1. Interactome of 24 tenderness markers

The 24 tenderness markers, used for interactome construction, are in red. Interactions with others proteins, which are in blue, are symbolised by a blue line. Proteins of the metabolism and structural proteins networks are delimited.

Figure 2. Functional analysis of sub-networks

The percentage of each function's occurrence in the concerned subnetwork is indicated.

A. CAPN1

B. HSPA1A

C. HSPA8

D. HSPB1

Figure 3. Functional analysis of tenderness interactome

The percentage of each function's occurrence in the tenderness is indicated.

Figure 4. Functional interactome of tenderness in muscular fibre

This interactome was made upon human databases to better understand tenderization processes in bovine muscle. Proteins involved in metabolism and structure are grouped respectively under the term "Metabolism" and "Structure". Functional interactions between proteins are symbolised with arrow, with a brief description. Heavy arrows indicate cellular functions done by proteins.

Figure 5. LT-muscle tenderness interactome

Proteins with a positive coefficient with tenderness in prediction equation are in red, negative in green. The coefficients are available only for the 24 protein markers studied.

Color range: -3 (green) to +3 (red)

Figure 6. ST-muscle tenderness interactome

Proteins with a positive coefficient with tenderness in prediction equation are in red, negative in green. The coefficients are available only for the 24 protein markers studied.

Color range: -3 (green) to +3 (red)

Figure 7. Muscle effect interactome

Up-regulated proteins in LT are in red, up-regulated in ST are in green. The muscle ratios are available only for the 24 protein markers studied.

Color range of ratio LT/ST: 0.7 (green) to 1.3 (red)

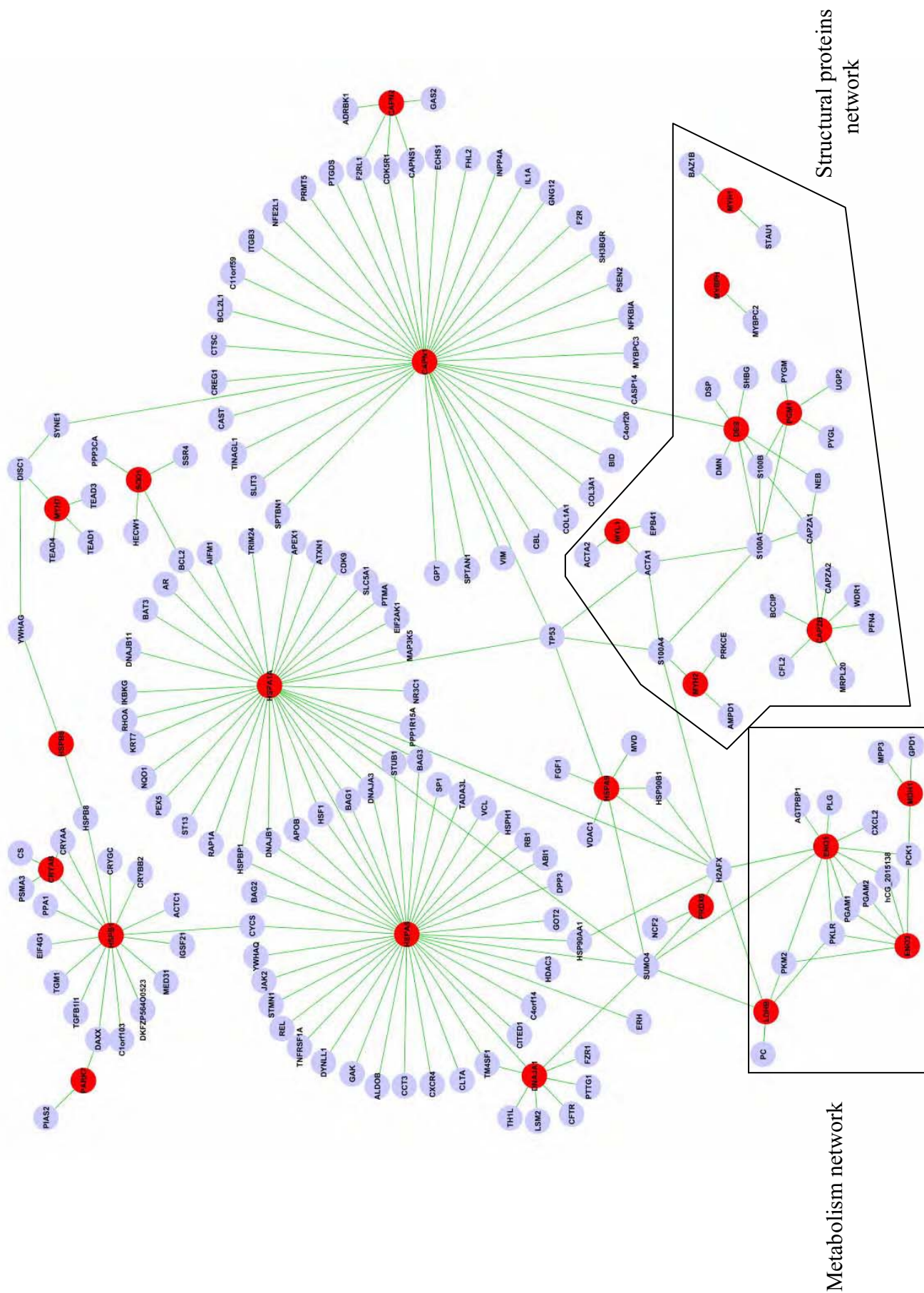


Figure 1. Interactome of 24 tenderness markers

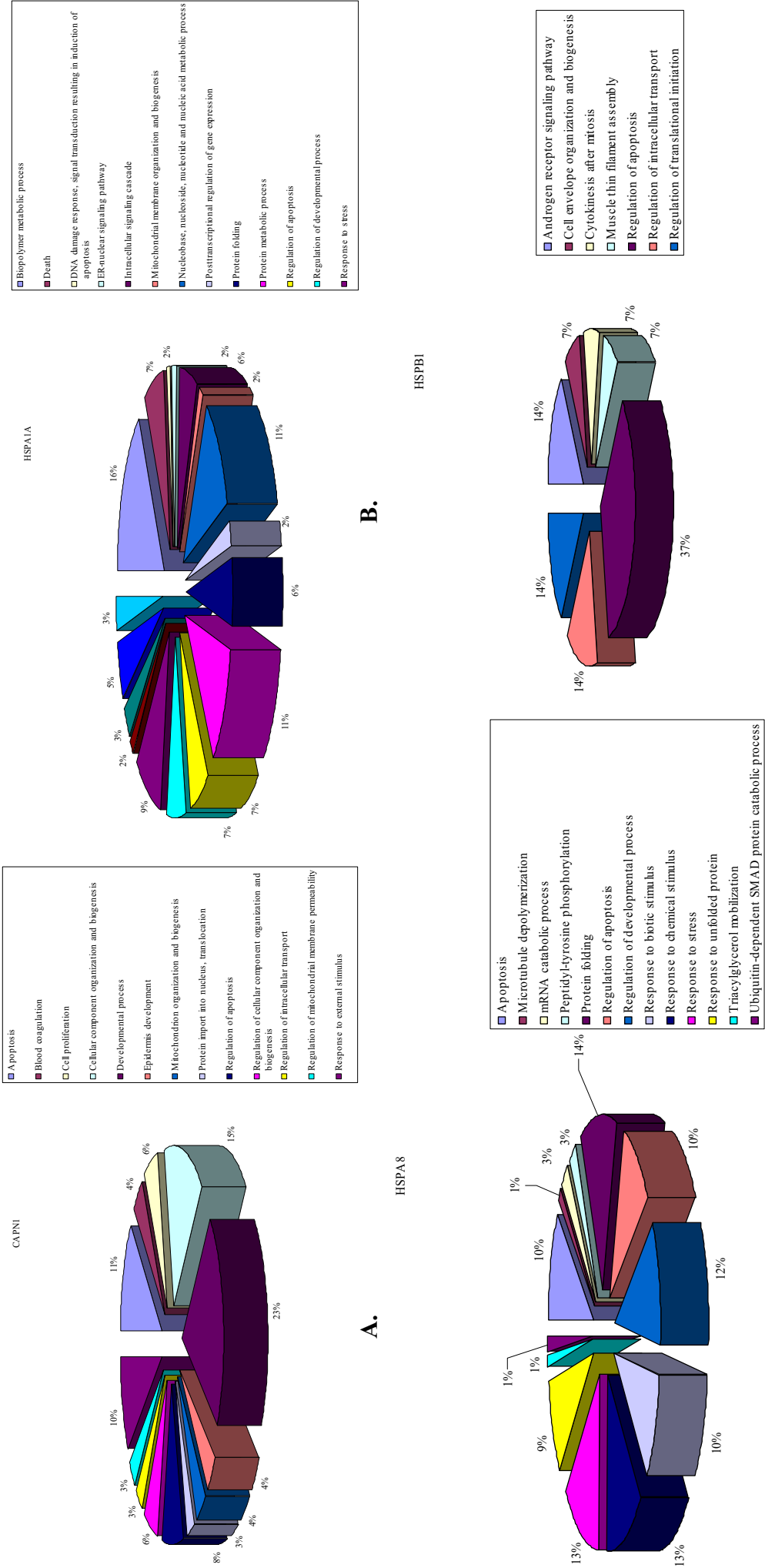


Figure 2. Functional analysis of sub-networks

Interactome

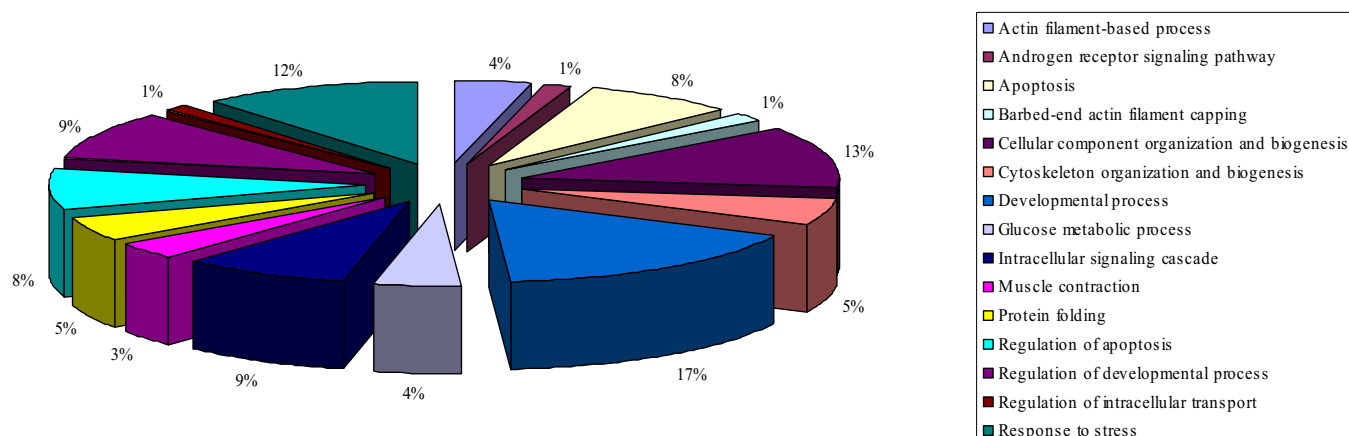


Figure 3. Functional analysis of tenderness interactome

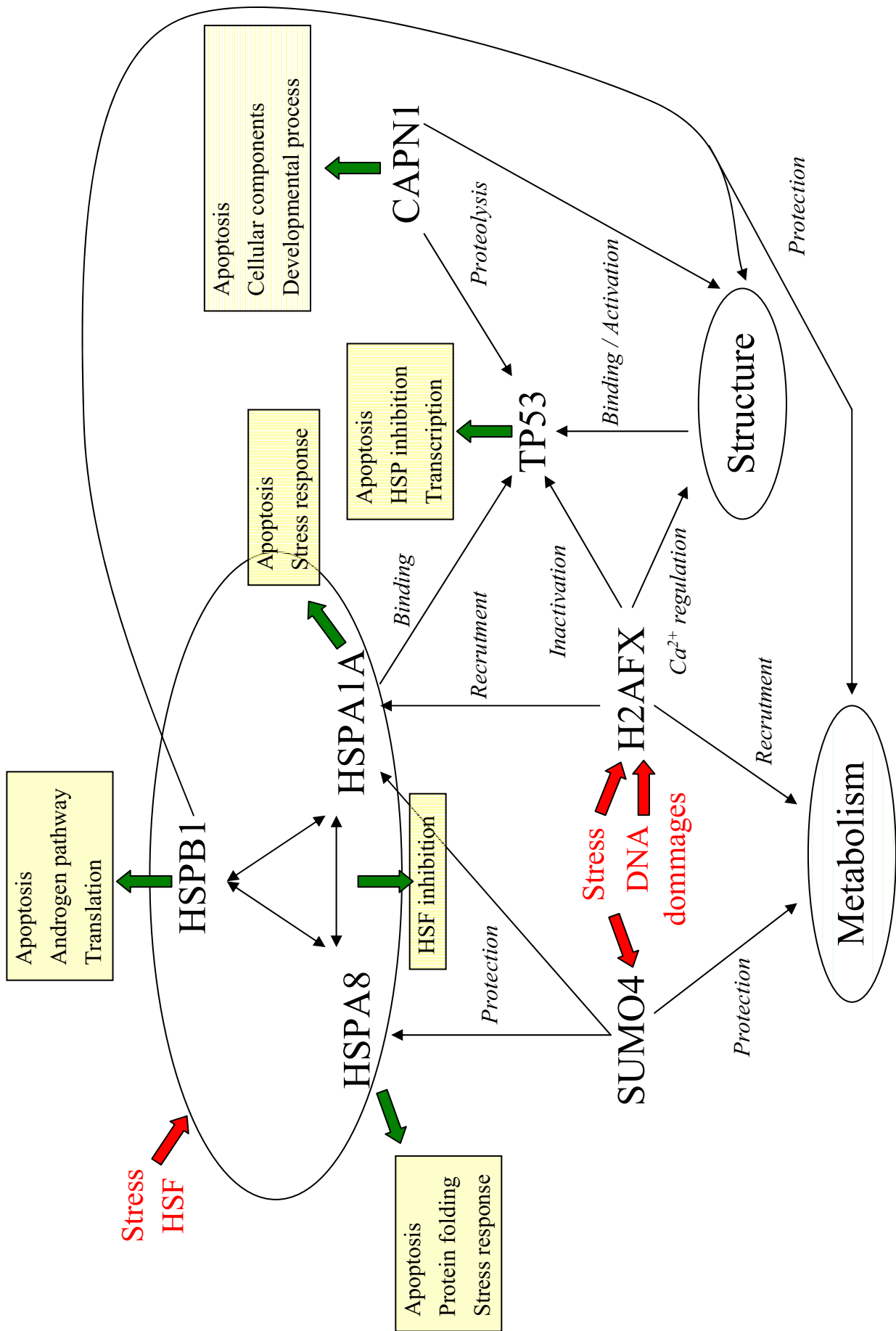


Figure 4. Functional interactome of tenderness in muscular fibre

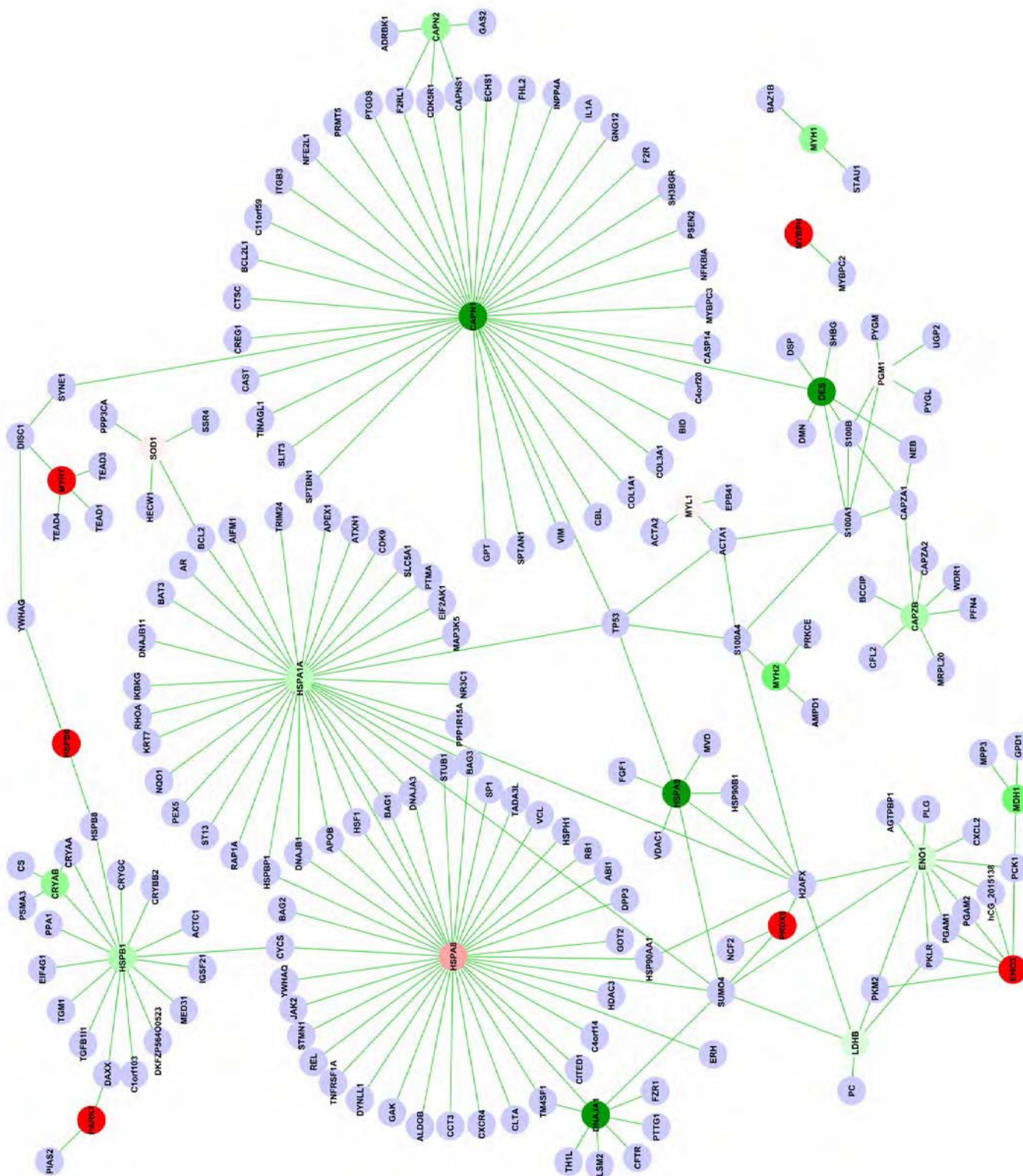


Figure 5. LT-muscle tenderness interactome

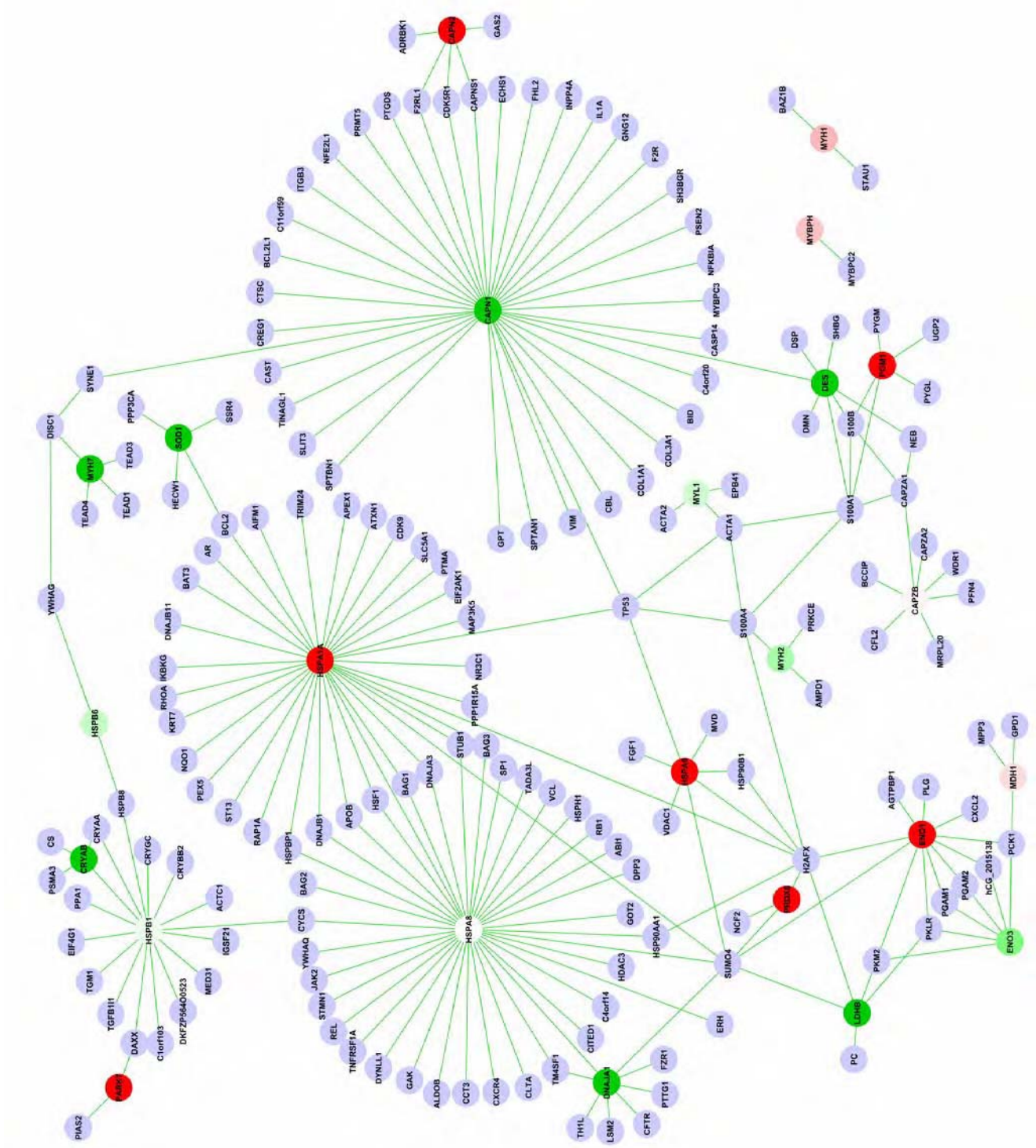


Figure 6. ST-muscle tenderness interactome

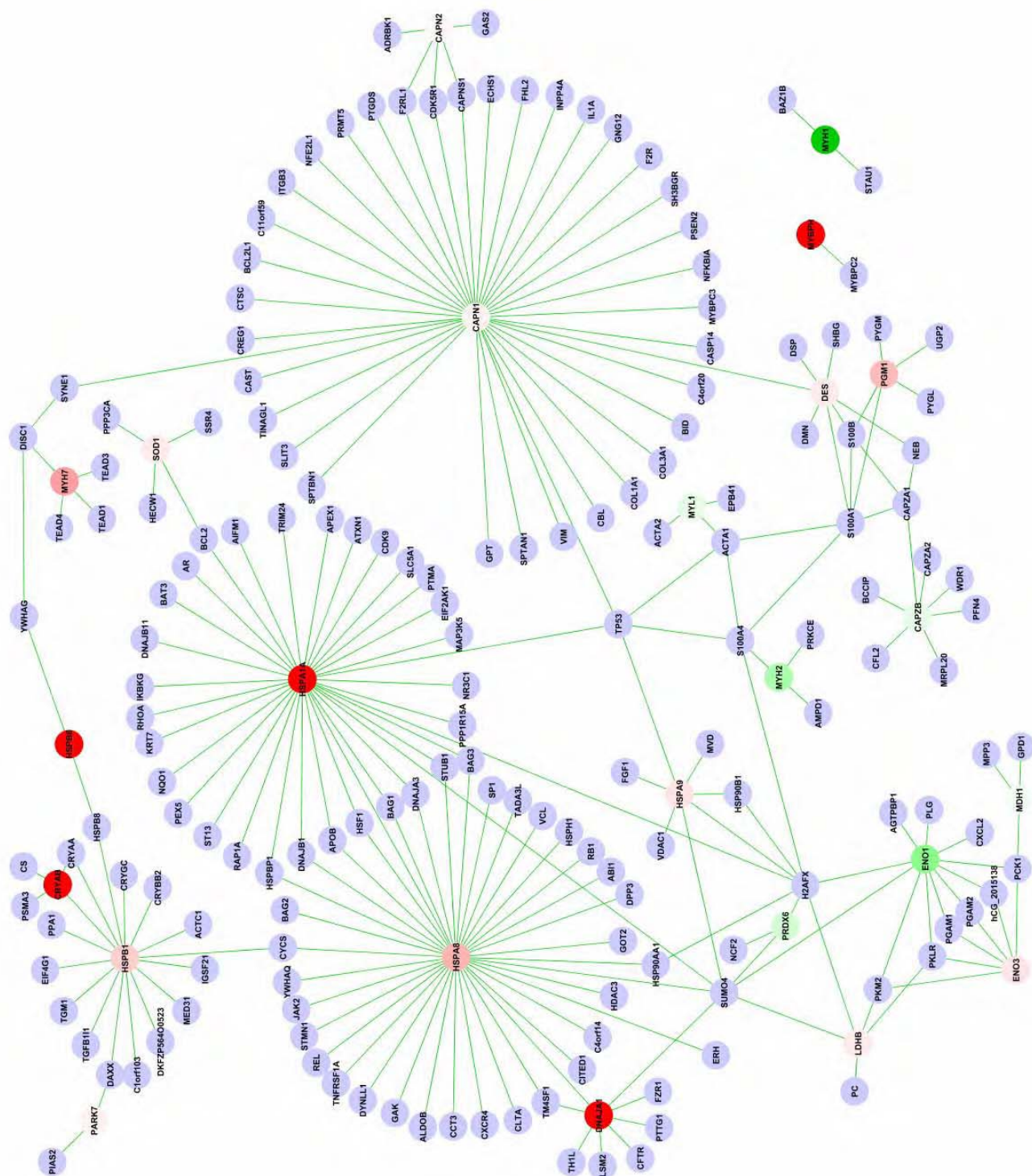


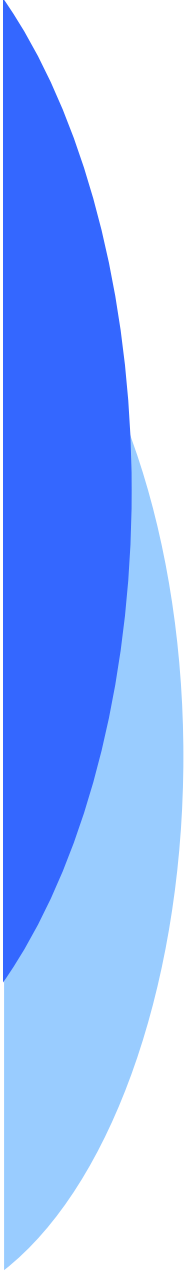
Figure 7. Muscle effect interactome

Cette étude a permis de replacer les marqueurs de tendreté dans un contexte plus global, afin d'apporter une meilleure compréhension de leurs interactions, et d'approfondir l'analyse des fonctions biologiques ayant un rôle important dans l'élaboration de la tendreté. La tendreté est ainsi définie comme une somme de mécanismes cellulaires, tels que l'apoptose ou le stress oxydant, qui ont chacun leur propre importance dans cette qualité. Ainsi, les protéines intervenant dans les mécanismes les plus explicatifs de la tendreté sont les plus pertinentes.

Cet interactome a permis également d'identifier des protéines potentiellement intéressantes de par leur position, formant des nœuds à la croisée de plusieurs voies métaboliques. C'est le cas de SUMO4, H2AFX et TP53. Il serait donc pertinent d'envisager des études ciblées sur ces protéines.

L'importance du stress oxydant et de l'apoptose, démontrée par les résultats précédents, est confortée par cet interactome qui montre que ces fonctions influencent fortement la mise en place de la tendreté. Ces résultats montrent également que la protection de protéines, par la famille des HSP20s, contribue positivement à la tendreté dans les deux muscles.

La construction de l'interactome et l'étude des fonctions cellulaires associées a également permis de faire le lien entre tendreté et pathologies humaines. En effet, des protéines responsables du repliement protéiques comme les HSPs sont également à l'origine de maladies comme Parkinson ou Alzheimer. Enfin, la poursuite de ce travail, en intégrant les marqueurs provenant d'autres programmes, permettra d'aller encore plus loin dans l'analyse.



Discussion générale

DISCUSSION GENERALE

La tendreté de la viande bovine est une qualité très complexe. Complexe de par l'implication de nombreux mécanismes cellulaires, mais également de par les différences qui existent entre les différents muscles, types d'animaux et races bovines.

Ainsi, depuis les débuts de la domestication des bovins il y a plus de 10 000 ans, ces derniers ont été sélectionnés sur différentes caractéristiques : production de lait, de viande, résistance au froid, à la chaleur et aux parasites. Ces sélections ont amené à la séparation de lignées divergentes, qui à terme, ont donné les races actuelles. C'est pour cela que les profils d'expression protéique entre races sont différents. Des marqueurs de tendreté identifiés sur une race donnée ne sont donc pas forcément impliqués dans une autre race. Ainsi, dans la grande diversité des marqueurs identifiés par une multitude d'étude à travers le monde et sur différentes races, il a été nécessaire de valider sur un grand nombre d'animaux certaines protéines parmi les plus pertinentes, ce qui a été effectué au cours de ce travail.

I Dot-Blot : un nouvel outil

La première étape de cette validation a été la mise au point de l'outil Dot-Blot. En effet, cette technique a permis de réaliser l'ensemble des quantifications dans les limites du temps imparti avec une grande fiabilité, ce qui a permis de réaliser des analyses statistiques plus complètes. Les caractéristiques du Dot-Blot sont très similaires aux caractéristiques d'une puce à anticorps, en terme de rapidité, capacité d'analyse et champs d'application (Wilson et Nock 2002, Lobke *et al* 2008). Une technique de Dot-Blot avait été employée pour mettre au point des tests immunologiques sur l'humain afin de détecter la présence d'antigènes caractéristiques de la bactérie *Echinococcus granulosus*, responsable d'infections graves affectant le foie et les reins (Mistrello *et al* 1995). Les avantages de ce test par Dot-Blot sont sa rapidité et sa facilité d'utilisation qui fait qu'il peut être réalisé dans un cabinet de médecin, non dans un laboratoire. Ces caractéristiques sont également celles recherchés pour un test de prédiction de la tendreté à disposition de la filière viande bovine. La mise au point de la technique Dot-Blot a donc permis de débiter une bonne partie du travail pour la mise au point de tests immunologiques à grande échelle à destination de la filière.

II Compréhension biologique de la tendreté

II.1 Relations entre HSP20s, HSP70s, apoptose, et tendreté

Ce travail a clairement identifié les protéines de la famille des HSP20s (α B-crystalline, Hsp20 et Hsp27) comme étant des marqueurs positifs de la tendreté, en particulier dans le muscle ST. Ces protéines séquestrent des facteurs pro-apoptotiques tels que Bax et Bcl2, et inhibent la formation de l'apoptosome (Concannon *et al* 2003). Le groupe HSP20 a donc une fonction anti-apoptotique. L'apoptose est un mécanisme cellulaire de mort programmé, au cours duquel les caspases dégradent des centaines de protéines différentes (Nakanishi *et al* 2001), dont des protéines assurant la cohésion des cellules et donc du muscle, comme par exemple la desmine (Chen *et al* 2003). L'importance de l'apoptose dans la mise en place de la tendreté a été avancée récemment par Ouali *et al* (2006). Dès la mort de l'animal, certaines cellules musculaires entreraient en apoptose, fragilisant la structure du muscle. Cette étape précoce dans l'élaboration de la tendreté serait déterminante dans la maturation de la viande. Ce travail a montré que le groupe HSP20, inhibant la mise en place de l'apoptose, est négativement lié à la tendreté du muscle LT, ce qui est concordant avec la théorie de Ouali *et al* (2006). En revanche cette relation est inversée dans le muscle ST, dans lequel ces HSP20s sont des marqueurs positifs de la tendreté, malgré leur fonction anti-apoptotique.

Il est intéressant de noter que ces protéines possèdent une autre fonction importante : ce sont des chaperonnes moléculaires, assurant la protection de certaines protéines contre des dénaturations (Sun et MacRae 2005). Elles protègent notamment les protéines de structure du muscle, l'actine, la desmine, la titine et la myosine (Golenhofen *et al* 2004). L'activité chaperonne des HSP20s permet aux protéines cibles de continuer à être fonctionnelles, en garantissant une forme tridimensionnelle correcte. Ainsi, les HSP20s empêchent la formation d'agrégats protéiques (Morzel *et al* 2008). Or, ces agrégats bloquent l'accès des protéines aux protéases comme les calpaïnes et les caspases lors de l'apoptose. Donc, bien que les HSP20s aient une fonction anti-apoptotique, ces protéines contribuent à faciliter les réactions de protéolyse des caspases au cours de l'apoptose après la mort de l'animal. Cela explique le rôle positif de ces protéines dans la tendreté du muscle ST.

Au sein du muscle ST, il existerait une compétition entre les substrats des HSP20s, les protéines de structure à protéger, et les facteurs pro-apoptotiques à séquestrer. Cette compétition est forte dans ce muscle car l'abondance des HSP20s dans le muscle ST est

inférieure au muscle LT, comme l'ont montré les résultats. Cette compétition est donc une balance importante dans la mise en place de la tendreté du ST.

D'autres HSPs sont importantes dans la tendreté : ce sont les HSP70s, identifiées comme des marqueurs négatifs, contrairement aux HSP20s. En effet, ces protéines séquestrent également des facteurs pro-apoptotiques comme BCL-2, inhibant l'apoptose (Beere et Green 2001). Ces protéines ont également une fonction de chaperonne, mais pas sur les protéines de structure. Cela explique que contrairement aux HSP20s, les HSP70s sont des marqueurs négatifs de la tendreté dans le muscle ST.

Ainsi, nos résultats démontrent pour la première fois que le rapport entre les HSP20s, favorisant l'accès aux protéines de structure, et HSP70s, anti-apoptotiques, est un paramètre important dans la prédiction de la tendreté.

II.2 Relation entre stress oxydant et tendreté

Un autre résultat marquant de ce travail est d'avoir démontré, par la relation très robuste entre PRDX6 et la tendreté quel que soit le contexte d'analyse, l'importance du stress oxydant dans la mise en place de la tendreté et donc, dans la prédictibilité de cette qualité. Les résultats du programme MUGENE avaient permis d'identifier pour la première fois la protéine PRDX6 comme étant un marqueur potentiel de la tendreté, ce qui a été confirmé par l'étude de Jia *et al* (2009). Cela a amené à sélectionner cette protéine comme une cible d'étude pour ce travail de thèse. Le stress oxydant, par une dégradation de protéines due aux radicaux libres de l'oxygène, entraînerait la formation d'agrégats protéiques (Morzel *et al* 2006), ce qui rendrait difficile l'accès aux protéines. Ces agrégats défavoriseraient la mise en place de la tendreté (Morzel *et al* 2008).

Les HSP20s empêchent donc la formation de ces agrégats. Ainsi, la relation positive entre HSP20s et tendreté est tout à fait concordante avec la relation négative entre le stress oxydant (PRDX6) et la tendreté, dans le muscle ST.

Comme les HSP20s, protégeant les protéines cellulaires contre le stress oxydant, sont des marqueurs de tendreté importants dans le muscle ST, il semblerait que le stress oxydant soit particulièrement défavorable à la tendreté dans ce muscle. Comme le ST est plutôt glycolytique, les cellules musculaires sont moins aptes à résister au stress oxydant que dans un muscle plus oxydatif comme le LT, c'est-à-dire qu'elles ne possèdent pas ou peu de protéines de lutte contre ce stress. Les effets muscles étudiés au cours de ce travail de thèse

ont montré qu'effectivement, le muscle ST contient moins de HSPs (HSP20s et HSP70s) que le LT. Un stress oxydant va donc engendrer la formation d'agrégats de protéines dégradées par les radicaux libres oxygène, défavorables à la tendreté.

Les groupes HSP20s, HSP70s et PRDX6 forment donc un ensemble dont le rôle dans la mise en place de la tendreté est primordial. Leur inclusion dans des tests de prédiction de tendreté est essentielle.

II.3 La tendreté : origine multifactorielle

L'intégration des différentes données dans un interactome fonctionnel a permis de bien dégager les principales fonctions cellulaires importantes dans la tendreté, telles que l'apoptose, le stress oxydant ou l'activité chaperonne. Toutes ces fonctions ne sont pas isolées les unes des autres mais sont intimement reliées par des protéines exerçant plusieurs fonctions, comme les HSPs, ou SUMO4, TP53 et H2AX. Cet interactome et l'analyse fonctionnelle en résultant apportent une vue globale de la tendreté d'un point de vue moléculaire et cellulaire.

Cela montre clairement que la tendreté ne dépend pas d'une seule protéine ou gène. Ainsi, un test de prédiction de la tendreté ne peut en aucun cas être constitué par l'analyse de l'expression d'un seul gène ou de l'abondance d'une seule protéine. Les différences d'implication des marqueurs de tendreté selon les muscles montrent également que la qualité d'une carcasse ne peut être évaluée à partir des caractéristiques d'un seul muscle.

La tendreté n'est pas un phénotype à proprement parler. C'est un ensemble de plusieurs phénotypes correspondant à une appréciation humaine (Guillemin *et al* 2009). Les marqueurs biologiques de cet assemblage sont donc divers et correspondent à plusieurs mécanismes cellulaires. Cette diversité a été améliorée au cours des âges, par la sélection de lignées bovines. Ceci a augmenté alors la complexité de la tendreté, qui reste un ensemble difficile à définir d'un point de vue de la physiologie cellulaire.

II.4 Comment influencer la tendreté du vivant de l'animal ?

Ce travail apporte les premières bases dans la constitution d'une base de données à disposition de la filière pour optimiser les systèmes de production. En effet, en connaissant les marqueurs de tendreté et leur interaction, il est possible de connaître les facteurs favorisant ou inhibant leur expression, afin d'optimiser la tendreté du vivant de l'animal. Par exemple, des

études ont montré qu'une privation de glucose provoque l'expression de la protéine Hsp70-GRP75 (Kaul *et al* 2007), dont l'abondance intervient négativement dans la tendreté. Assurer et contrôler une bonne assimilation du glucose par l'animal permettrait donc de favoriser la mise en place de la tendreté de la viande à sa mort. Donc, en prenant en compte le type de muscle et le type d'animal (Guillemin *et al* 2010), au travers de modification de la ration alimentaire ou du rythme de l'animal (Cassar-Malek *et al* 2009), il sera possible d'optimiser l'expression de marqueurs pertinents de la tendreté.

Des études sont en cours pour préciser l'influence des facteurs d'élevage sur l'expression de ces protéines. Par exemple, l'étude de Cassar-Malek *et al* (2010) a montré que l'expression du gène DNAJA1 et l'abondance de la protéine Hsp40 augmentent dans les muscles les plus oxydatifs tels que le *rectus abdominis* et le *triceps brachii*, et dans les jeunes animaux. L'abondance de cette protéine n'est cependant pas modifiée par les facteurs de stress.

III Modélisation et prédiction de la tendreté

III.1 Différences avec les études antérieures dans la validation de marqueurs

La différence entre les résultats des études antérieures, qui avaient identifié des marqueurs potentiels, et les résultats de ce travail, qui invalident certains marqueurs, tient au contexte d'étude. En effet, les études de génomique antérieures ont analysé des effectifs très faibles ($N = 4$ à 10), et de plus, les échantillons de viande analysés avaient des notes TG ou mesures WB extrêmes. Ainsi, les corrélations entre protéine et tendreté sont tirées par ces extrêmes peu nombreux. Le présent travail de thèse a analysé tout un ensemble d'échantillons ($N = 111$ par muscle), aux notes et mesures avec des valeurs réparties, comprenant des extrêmes, mais surtout des individus aux notes intermédiaires. Ces intermédiaires sont beaucoup plus difficiles à caractériser que les extrêmes. En conséquence, les corrélations entre protéines et tendreté deviennent beaucoup moins claires. C'est pour cela que de nombreuses protéines présentées comme marqueurs de tendreté dans des études antérieures ne sont pas validées dans ce travail. De plus, les différentiels d'expression des gènes, ayant permis d'identifier des marqueurs potentiels au niveau ARNm, ne correspondent pas automatiquement à un même différentiel d'abondance de protéine. L'exemple de Hsp40 est particulièrement illustratif. L'expression du gène DNAJA1, codant la protéine Hsp40, a été corrélée à la dureté de la viande et même brevetée (Bernard *et al* 2007). C'est pourquoi la protéine Hsp40 a été

sélectionnée comme cible d'étude pour ce travail. Les résultats, sur la même race Charolaise et le même muscle LT, n'ont pas validé de relation entre la protéine Hsp40 et la tendreté.

Il y a une différence importante dans le nombre de protéines validées comme marqueurs entre le muscle LT et ST. Si beaucoup de protéines ont été validées comme marqueur dans le muscle ST, c'est loin d'être le cas pour le muscle LT. Cependant, des caractéristiques musculaires (teneur en collagène, en lipides...) permettent d'expliquer la tendreté ou la dureté à la fois dans les deux muscles. Cela laisse donc supposer que la tendreté du LT répond aux mêmes mécanismes biologiques que le ST, mais que d'autres protéines que celles analysées au cours de la thèse, intervenant dans ces mécanismes, expliquent la tendreté du muscle LT. Des études complémentaires sur ce muscle LT permettraient de compléter les résultats.

III.2 Mise au point d'équations de prédiction

Au début de ce travail de thèse, aucune équation n'était disponible pour prédire la tendreté de la viande bovine à partir d'abondances de protéines. Ce travail a développé des équations, par les approches prédictives globale et ciblée.

Les équations de l'approche globale ne permettent pas de prédire la tendreté sur l'ensemble des échantillons, mais les corrélations entre notes prédite et réelle sont satisfaisantes ($r^2 = 0,69$ à $0,86$) et ouvrent la voie à d'autres analyses afin de les améliorer, notamment pour prédire l'ensemble de la population. Ces équations ont montré qu'une population de même type (c'est-à-dire constituée d'échantillons de même muscle, de même race) n'est pas homogène en termes de prédictibilité de la tendreté. En effet, en appliquant une seule équation, la majorité des échantillons est prédictible, tandis qu'une minorité ne l'est absolument pas. La tendreté de ces derniers échantillons doit résulter de l'action d'autres marqueurs, non étudiés dans ce travail. Il existe donc une variabilité de la tendreté à un niveau supplémentaire, après la variabilité de race, type d'animal ou muscle. C'est l'implication de l'ensemble des 24 protéines analysées qui permet d'apporter de l'information sur la variabilité de la tendreté et donc de prédire les mesures et notes. Il est possible d'affiner ces équations en remplaçant les protéines peu explicatives par d'autres, au cours d'études ultérieures portant sur d'autres protéines.

Quant aux équations de l'approche ciblée, elles permettent de prédire la tendreté avec une corrélation moins bonne, mais restent valables sur l'ensemble de la population testée. Ces équations sont constituées de peu de protéines. Cela explique que contrairement aux équations

de l'approche globale, les équations de l'approche ciblée expliquent moins la tendreté. Elles confirment les résultats de l'approche prédictive globale.

Toutes ces équations constituent une base solide pour la mise au point d'outils de prédiction de la viande bovine et elles seront enrichies de données phénotypiques.

III.3 Les limites du travail

Ce travail a porté sur l'analyse de 24 protéines. C'est un nombre assez faible compte-tenu de la multitude de protéines différentes dans le muscle. Les études antérieures ont révélé bien d'autres protéines qui n'ont pas été analysées au cours de cette thèse, pour des raisons de temps ou de disponibilité d'anticorps. Ainsi, des données et informations probablement importantes dans la prédictibilité de la tendreté n'ont pas été obtenues et manquent très certainement dans la validation de protéines comme marqueurs et la mise au point de l'équation.

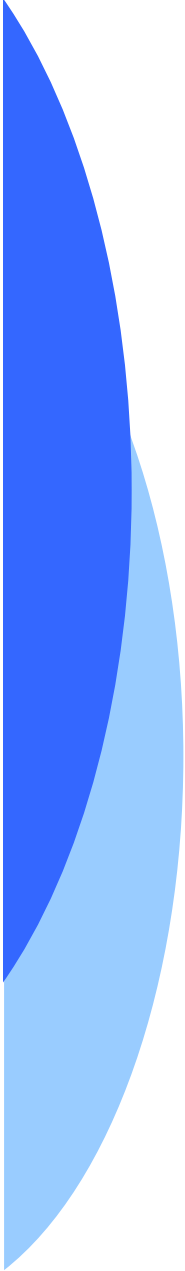
De plus, la technique et les anticorps utilisés ont permis d'analyser uniquement l'abondance des protéines, et non de déterminer la proportion des isoformes. Or, le muscle squelettique exprime beaucoup d'isoformes différents pour une protéine donnée. Par exemple, certains isoformes de la protéine Hsp27 ont été corrélés positivement avec la tendreté par des études antérieures, et d'autres isoformes négativement (Chaze *et al* 2009). Les données de cette thèse somment ainsi les quantités de toutes les isoformes d'une protéine donnée, les anticorps employés ne permettant pas de faire la distinction. Ainsi, certaines protéines non validées ou très peu liées à la tendreté dans ce travail pourraient être cependant de bons marqueurs de tendreté, seulement en considérant une isoforme particulière.

Enfin, malgré le grand nombre d'échantillons analysés, le nombre de contextes pris en compte dans ce travail reste faible. Bien qu'il existe des différences entre bœufs et taurillons, ces deux contextes sont assez proches, et l'analyse de vaches, génisses ou veaux aurait permis de compléter les données. De plus, valider des protéines comme marqueurs et proposer des équations sur des vaches aurait permis de se rapprocher des réalités de l'élevage et du marché de la viande bovine, les vaches étant les plus consommées en France.

III.4 L'évaluation de la tendreté sensorielle

Ce travail n'a pas permis de dégager des protéines pertinentes et des équations fiables pour la note de tendreté sensorielle du muscle LT, bien que des équations aient été validées pour la

mesure WB. La corrélation entre note TG et mesure WB pour le muscle LT n'est que de -0,24, ce qui est très insuffisant. Les notes TG (non corrigées) sont en moyenne de 4,81, avec un maximum à 6,72 et un minimum à 2,72. Entre le maximum et le minimum, le rapport est de 2,4, alors que pour la mesure WB, ce rapport est de 3,7. De plus, aucun échantillon du muscle LT présente une note de tendreté supérieure (c'est-à-dire supérieure à 7), seuls 6 échantillons sur 111 ont une note TG supérieure à 6. Les notes TG sont donc peu dispersées, regroupées autour de la note moyenne de 4,81, et ne permettent pas d'apporter une certaine résolution statistique, ce qui empêche la détection de marqueurs. Pour un muscle de bonne tendreté comme le LT, les notes TG sont donc plus faibles qu'attendues. Les membres du jury de dégustation ont sûrement sous noté les échantillons de bonne qualité, ces derniers étant classés dans la catégorie de tendreté moyenne. De plus, la corrélation entre note TG et mesure WB pour le programme MUGENE est faible (-0,25). Cette corrélation est plus importante dans d'autres études (-0,72 dans l'étude de Destefanis *et al*, 2008). La tendreté sensorielle est une caractéristique tout à fait logique et pertinente à étudier, car elle correspond au sens humain. Cependant, son mode d'évaluation fait qu'elle est peu fiable. Au contraire, la mesure WB est fiable et répétable, mais elle ne correspond pas aux sens humains. Cependant, c'est cette dernière qui permet de développer des équations et de valider des protéines comme marqueurs. Il faudrait donc proposer d'autres moyens plus fiables d'évaluer la tendreté sensorielle pour pouvoir travailler avec ces données.



Conclusion et Perspectives

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les objectifs de la thèse ont été atteints. Les résultats originaux à retenir sont :

- La mise au point de l'outil Dot-Blot, technique immunologique de quantification de protéines sur un grand nombre d'échantillons, « prototype » des tests de prédiction de tendreté.
- La démonstration par des données expérimentales pour la première fois de l'importance du couple HSPs / protéines anti-oxydantes et la confirmation de l'importance de l'apoptose dans la tendreté.
- La validation et l'invalidation de protéines comme marqueurs potentiels de tendreté sur un grand nombre d'échantillon.
- La démonstration que la tendreté a une origine multifactorielle et ne peut pas être prédite seulement par l'expression d'un seul gène ou l'abondance d'une seule protéine.
- Le développement des premières équations de prédiction, qui demandent à être validées sur de grands effectifs.
- La construction d'un interactome fonctionnel de la tendreté de la viande bovine

Ce travail de thèse ouvre la porte à d'autres études complémentaires. En premier lieu, les équations doivent être validées sur d'autres échantillons, surtout sur des types d'animaux et races différents. Afin d'adapter des équations à de nombreux contextes différents, il faudra probablement effectuer des réajustements des coefficients. Dans un second temps, des études complémentaires pourraient être menées afin de valider d'autres protéines comme marqueurs potentiels, non analysées dans cette thèse, mais également d'autres protéines qui semblent pertinentes d'après leur rôle dans l'interactome, comme SUMO4 (protéine de sumoylation de protéines impliquées dans les stress), TP53 (contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose) et H2AFX (histone protégeant l'ADN lors de stress). Ces résultats permettraient d'enrichir les équations afin que ces dernières puissent prédire la tendreté avec une fiabilité supérieure. D'autre part, cela permettrait de retirer de l'équation les protéines les moins impliquées, et donc d'alléger le dispositif de test.

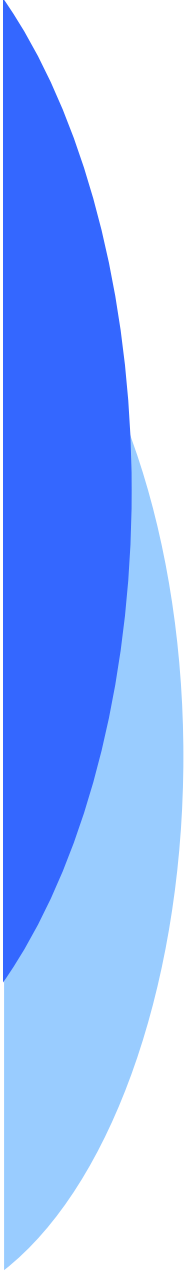
Le stade ultime de l'ensemble de ces études permettrait d'aboutir à un test de prédiction de la tendreté à destination de la filière bovine. Pour cela, il faudrait réaliser un test

immunologique rassemblant les protéines les plus impliquées dans les équations, et permettant d'expliquer la plus grande partie de la variabilité de la tendreté. Pour réaliser un tel test, il suffirait d'inverser la technique du Dot-Blot : au lieu de déposer des extraits protéiques d'un grand nombre d'échantillon sur une membrane, puis hybrider avec un anticorps spécifique d'une protéine, il suffirait de déposer sur la membrane les anticorps des différentes protéines validées comme marqueur par l'équation, et d'hybrider avec une solution de protéines totales d'un échantillon. Une membrane serait comparable à une puce à protéine, pouvant analyser simultanément l'ensemble des paramètres de l'équation d'un échantillon donné. Cette technique présente l'avantage par rapport à une puce (ADN, protéine) d'être techniquement plus facile à réaliser et financièrement peu onéreuse. Ce genre de tests serait donc très pratique pour un abattoir, qui ne dispose pas des mêmes moyens qu'un laboratoire de biologie moléculaire. De plus, cela permettrait de travailler aussi sur l'animal vivant, à partir de biopsies.

Pour mieux comprendre les mécanismes à l'origine de la tendreté, il est nécessaire d'étudier non seulement l'expression des différents marqueurs, mais également leur interaction entre eux. Ces études fonctionnelles constituent les objectifs d'une nouvelle thèse du laboratoire. Elle consiste à invalider, chez des souris, les gènes de protéines validées comme marqueurs situées à des nœuds de réseaux fonctionnels, tels que la Hsp27, et à étudier l'expression de ses partenaires (comme les autres HSPs, PRDX6...). Ces études fondamentales devraient apporter des informations pertinentes dans la compréhension des mécanismes à l'origine de la tendreté, et d'étudier les effets des conduites d'élevage sur l'expression des protéines-clé. Ceci permettra de proposer en complément, des leviers d'action sur les systèmes d'élevage, afin d'optimiser l'expression de marqueurs de tendreté.

Enfin, l'interactome et les études de fonction des protéines ont montré que de nombreuses protéines, marqueurs de tendreté, et mécanismes à l'origine de la tendreté sont également responsables de pathologies humaines telles que la maladie de Parkinson, Alzheimer, les dystrophies, ou encore les cancers. C'est le cas pour les HSPs, dont les fonctions sont très diverses et affectent de nombreuses réactions cellulaires. L'une de ces réactions largement impliquée dans le développement des cancers est l'apoptose. En effet, des dysfonctionnements dans l'apoptose sont souvent liés à des cancers (Kaul *et al* 2007). Le stress oxydant, dans lequel interviennent les HSP et PRDX6, est également lié au développement de dystrophies (Powers *et al* 2007). La modification des interactions, causées par des mutations, entre ces protéines et des protéines de structures de muscle est responsable

de myopathies (Vicart *et al* 1998). Afin de partager et de planifier des études communes, il serait intéressant de mettre en place des collaborations dans le cadre de projets portant sur ces pathologies humaines. Le muscle bovin étant très proche du muscle humain, les bovins peuvent être considérés comme de bons modèles pour ces études.



Références bibliographiques

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

Agarkova, I. and Perriard, J. C., 2005. The m-band: An elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere. *Trends in Cell Biology* 15 (9): 477-485.

Ashmore, C. R. and Doerr, L., 1971. Comparative aspects of muscle fiber types in different species. *Experimental Neurology* 31 (3): 408-418.

-B-

Barendse, W., 2002. DNA markers for meat tenderness. *Patent WO02064820*.

Barendse, W., Harrison, B. E., Hawken, R. J., Ferguson, D. M., Thompson, J. M., Thomas, M. B. and Bunch, R. J., 2007. Epistasis between calpain 1 and its inhibitor calpastatin within breeds of cattle. *Genetics* 176 (4): 2601-2610.

Beere, H. M. and Green, D. R., 2001. Stress management - heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. *Trends in Cell Biology* 11 (1): 6-10.

Beja-Pereira, A., Caramelli, D., Lalueza-Fox, C., Vernesi, C., Ferrand, N., Casoli, A., Goyache, F., Royo, L. J., Conti, S., Lari, M., Martini, A., Ouragh, L., Magid, A., Atash, A., Zsolnai, A., Boscato, P., Triantaphylidis, C., Ploumi, K., Sineo, L., Mallegni, F., Taberlet, P., Erhardt, G., Sampietro, L., Bertranpetit, J., Barbujani, G., Luikart, G. and Bertorelle, G., 2006. The origin of european cattle: Evidence from modern and ancient DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (21): 8113-8118.

Bendixen, E., 2005. The use of proteomics in meat science. *Meat Science* 71 (1): 138-149.

Bernard, C., Cassar-Malek, I., LeCunff, M., Dubroeuq, H., Renand, G. and Hocquette, J. F., 2007. New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (13): 5229-5237.

Bouley, J., 2004. *Analyse protéomique du muscle squelettique bovin*. Thèse (Dr. d'Université) option Biochimie, Université de Clermont-Ferrand 2.

Bouley, J., Chambon, C. and Picard, B., 2004. Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 4 (6): 1811-1824.

Bouley, J., Meunier, B., Chambon, C., De Smet, S., Hocquette, J. F. and Picard, B., 2005. Proteomic analysis of bovine skeletal muscle hypertrophy. *Proteomics* 5 (2): 490-500.

Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 248-254.

Bradley, D. G., MacHugh, D. E., Cunningham, P. and Loftus, R. T., 1996. Mitochondrial diversity and the origins of african and european cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (10): 5131-5135.

Brooke, M. H. and Kaiser, K. K., 1970. Muscle fiber types: How many and what kind? *Archives of Neurology* 23 (4): 369-379.

-C-

Cassar-Malek, I., Guillemin, N., Hocquette, J. F., Micol, D., Bauchart, D. and Picard, B., 2010. Expression of dnaj1 in bovine muscles according to developmental age and management factors. *Animal* (In press).

Cassar-Malek, I., Jurie, C., Bernard, C., Barnola, I., Micol, D. and Hocquette, J. F., 2009. Pasture-feeding of charolais steers influences skeletal muscle metabolism and gene expression. *Journal of Physiology and Pharmacology* 60 83-90.

Chaze, T., Bouley, J., Chambon, C., Barboiron, C. and Picard, B., 2006. Mapping of alkaline proteins in bovine skeletal muscle. *Proteomics* 6 (8): 2571-2575.

Chaze, T., Hocquette, J. F., Meunier, B., Renan, G., Journaux, L., Capel, C. and Picard, B., 2009. Recherche de marqueurs de tendreté de la viande de jeunes bovins de races à viande par analyse protéomique. In: Rencontres Recherches Ruminants, Paris. p 151-154.

Chen, F., Chang, R., Trivedi, M., Capetanaki, Y. and Cryns, V. L., 2003. Caspase proteolysis of desmin produces a dominant-negative inhibitor of intermediate filaments and promotes apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 278 (9): 6848-6853.

Chikuni, K., Muroya, S. and Nakajima, I., 2004. Myosin heavy chain isoforms expressed in bovine skeletal muscles. *Meat Science* 67 (1): 87-94.

Clark, K. A., McElhinny, A. S., Beckerle, M. C. and Gregorio, C. C., 2002. Striated muscle cytoarchitecture: An intricate web of form and function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 18 637-706.

Concannon, C. G., Gorman, A. M. and Samalli, A., 2003. On the role of hsp27 in regulating apoptosis. *Apoptosis* 8 (1): 61-70.

Crouse, J. D., Koohmaraie, M. and Seideman, S. D., 1991. The relationship of muscle fibre size to tenderness of beef. *Meat Science* 30 (4): 295-302.

Cusick, M. E., Klitgord, N., Vidal, M. and Hill, D. E., 2005. Interactome: Gateway into systems biology. *Human Molecular Genetics* 14 (suppl_2): R171-181.

Cymbron, T., Freeman, A. R., Malheiro, M. I., Vigne, J. D. and Bradley, D. G., 2005. Microsatellite diversity suggests different histories for mediterranean and northern

European cattle populations. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 272 (1574): 1837-1843.

-D-

Destefanis, G., Brugiapaglia, A., Barge, M. T. and Dal Molin, E., 2008. Relationship between beef consumer tenderness perception and Warner-Bratzler shear force. *Meat Science* 78 (3): 153-156.

Diamond, J., 2002. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature* 418 (6898): 700-707.

Dransfield, E., Abouelkaram, S., Bauchart, D., Culioli, J., Jurie, C., Lepetit, J., Listrat, A., Martin, J. F. and Picard, B., 2002. *Qualité sensorielle de la viande provenant de 3 muscles de taurillons et de vaches de réforme des 4 races allaitantes du massif central.* In: 9. Rencontres, Paris (FRA). p 255-258.

Dransfield, E., Martin, J. F., Bauchart, D., Abouelkaram, S., Lepetit, J., Culioli, J., Jurie, C. and Picard, B., 2003. Meat quality and composition of three muscles from French cull cows and young bulls. *Animal Science* 76 387-399.

-E-

Edwards, C. J., Bollongino, R., Scheu, A., Chamberlain, A., Tresset, A., Vigne, J. D., Baird, J. F., Larson, G., Ho, S. Y. W., Heupink, T. H., Shapiro, B., Freeman, A. R., Thomas, M. G., Arbogast, R. M., Arndt, B., Bartosiewicz, L., Benecke, N., Budja, M., Chaix, L., Choyke, A. M., Coqueugniot, E., Dohle, H. J., Goldner, H., Hartz, S., Helmer, D., Herzig, B., Hongo, H., Mashkour, M., Ozdogan, M., Pucher, E., Roth, G., Schade-Lindig, S., Schmolcke, U., Schulting, R. J., Stephan, E., Uerpmann, H. P., Voros, I., Voytek, B., Bradley, D. G. and Burger, J., 2007. Mitochondrial DNA analysis shows a near eastern neolithic origin for domestic cattle and no indication of domestication of European aurochs. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 274 (1616): 1377-1385.

Elsik, C. G., Tellam, R. L. and Worley, K. C., 2009. The genome sequence of taurine cattle: A window to ruminant biology and evolution. *Science* 324 (5926): 522-528.

-F-

Fink, A. L., 1999. Chaperone-mediated protein folding. *Physiological Reviews* 79 (2): 425-449.

Finlay, E. K., Gaillard, C., Vahidi, S. M. F., Mirhoseini, S. Z., Jianlin, H., Qi, X. B., El-Barody, M. A. A., Baird, J. F., Healy, B. C. and Bradley, D. G., 2007. Bayesian inference of population expansions in domestic bovines. *Biology Letters* 3 (4): 449-452.

-G-

Geay, Y., Bauchart, D., Hocquette, J. F. and Culioli, J., 2001. Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. *Reproduction Nutrition Development* 41 (1): 1-26. Erratum, 41, 377.

Gilbert, R., Cohen, J. A., Pardo, S., Basu, A. and Fischman, D. A., 1999. Identification of the a-band localization domain of myosin binding proteins c and h (mybp-c, mybp-h) in skeletal muscle. *Journal of Cell Science* 112 (1): 69-79.

Golenhofen, N., Perng, M. D., Quinlan, R. A. and Drenckhahn, D., 2004. Comparison of the small heat shock proteins alpha b-crystallin, mkbp, hsp25, hsp20, and cvhsp in heart and skeletal muscle. *Histochemistry and Cell Biology* 122 (5): 415-425.

Gordon, A. M., Homsher, E. and Regnier, M., 2000. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiological Reviews* 80 (2): 853-924.

Gotherstrom, A., Anderung, C., Hellborg, L., Elburg, R., Smith, C., Bradley, D. G. and Ellegren, H., 2005. Cattle domestication in the near east was followed by hybridization with aurochs bulls in europe. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 272 (1579): 2345-2350.

Grefte, S., Kuijpers-Jagtman, A. M., Torensma, R. and Von den Hoff, J. W., 2007. Skeletal muscle development and regeneration. *Stem Cells and Development* 16 (5): 857-868.

Guillemin, N., Cassar-Malek, I., Hocquette, J. F., Jurie, C., Micol, D., Listrat, A., Levéziel, H., Renand, G. and Picard, B., 2009. La maîtrise de la tendreté de la viande bovine : Identification de marqueurs biologiques. *INRA Productions Animales* 22 (4): 331-344.

Guillemin, N., Jurie, C., Cassar-Malek, I., Hocquette, J. F., Renan, G. and Picard, B., 2010. Variations in the abundance of 24 proteins biomarkers of beef tenderness according to muscle and animal type. *Animal* (In Press).

-H-

Harper, G. S., 1999. Trends in skeletal muscle biology and the understanding of toughness in beef. *Australian Journal of Agricultural Research* 50 (7): 1105-1129.

Herrera-Mendez, C. H., Becila, S., Boudjellal, A. and Ouali, A., 2006. Meat ageing: Reconsideration of the current concept. *Trends in Food Science & Technology* 17 (8): 394-405.

Hocquette, J. F., Bernard, C., Cassar-Malek, I., Lepetit, J., Micol, D., Jurie, C., Meunier, B., Renand, G. and Picard, B., 2007a. Mise en évidence de marqueurs de tendreté de la viande bovine par des approches de génomique fonctionnelle (projet mugene). In: 3R, Paris

Hocquette, J. F., Cassar-Malek, I., Listrat, A., Jurie, C., Jailler, R. and Picard, B., 2005a. Evolution des recherches sur le muscle des bovins et la qualité sensorielle de leur viande i. Vers une meilleure connaissance de la biologie musculaire. *Cahiers Agricultures* 14 (3): 283-289.

Hocquette, J. F., Cassar-Malek, I., Listrat, A., Jurie, C., Jailler, R. and Picard, B., 2005b. Evolution des recherches sur le muscle des bovins et la qualité sensorielle de leur viande ii. Influence des facteurs d'élevage sur les caractéristiques musculaires. *Cahiers Agricultures* 14 (4): 365-372.

Hocquette, J. F., Lehnert, S. A., Barendse, W., Cassar-Malek, I. and Picard, B., 2007b. Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. *Animal* 1 159-173.

Houbak, M. B., Erthbjerg, P. and Therkildsen, M., 2008. In vitro study to evaluate the degradation of bovine muscle proteins post-mortem by proteasome and mu-calpain. *Meat Science* 79 (1): 77-85.

-I-

Ingram, C. J. E., Mulcare, C. A., Itan, Y., Thomas, M. G. and Swallow, D. M., 2009. Lactose digestion and the evolutionary genetics of lactase persistence. *Human Genetics* 124 (6): 579-591.

-J-

Jia, X., Hollung, K., Therkildsen, M., Hildrum, K. I. and Bendixen, E., 2006. Proteome analysis of early post-mortem changes in two bovine muscle types: M. Longissimus dorsi and m. Semitendinosus. *Proteomics* 6 (3): 936-944.

Jia, X., Veiseth-Kent, E., Grove, H., Kuziora, P., Aass, L., Hildrum, K. I. and Hollung, K., 2009. Peroxiredoxin-6 - a potential protein marker for meat tenderness in bovine m. Longissimus thoracis muscle. *Journal of Animal Science* 87 (7): 2391-2399.

Jurie, C., Cassar-Malek, I., Bonnet, M., Leroux, C., Bauchart, D., Boulesteix, P., Pethick, D. W. and Hocquette, J. F., 2007. Adipocyte fatty acid-binding protein and mitochondrial enzyme activities in muscles as relevant indicators of marbling in cattle. *Journal of Animal Science* 85 (10): 2660-2669.

-K-

Kaul, S. C., Deocaris, C. C. and Wadhwa, R., 2007. Three faces of mortalin: A housekeeper, guardian and killer. *Experimental Gerontology* 42 (4): 263-274.

Kontrogianni-Konstantopoulos, A., Catino, D. H., Strong, J. C., Randall, W. R. and Bloch, R. J., 2004. Obscurin regulates the organization of myosin into a bands. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 287 (1): C209-C217.

Koohmaraie, M. and Geesink, G. H., 2006. Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Science* 74 (1): 34-43.

Koohmaraie, M., Kent, M. P., Shackelford, S. D., Veiseth, E. and Wheeler, T. L., 2002. Meat tenderness and muscle growth: Is there any relationship? *Meat Science* 62 (3): 345-352.

-L-

Lametsch, R., Karlsson, A., Rosenvold, K., Andersen, H. J., Roepstorff, P. and Bendixen, E., 2003. Postmortem proteome changes of porcine muscle related to tenderness. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (24): 6992-6997.

Lange, S., Agarkova, I., Perriard, J. C. and Ehler, E., 2005a. The sarcomeric m-band during development and in disease. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 26 (6-8): 375-379.

Lange, S., Ehler, E. and Gautel, M., 2006. From a to z and back? Multicompartiment proteins in the sarcomere. *Trends in Cell Biology* 16 (1): 11-18.

Lange, S., Himmel, M., Auerbach, D., Agarkova, I., Hayess, K., Furst, D. O., Perriard, J. C. and Ehler, E., 2005b. Dimerisation of myomesin: Implications for the structure of the sarcomeric m-band. *Journal of Molecular Biology* 345 (2): 289-298.

Laville, E., Sayd, T., Terlouw, C., Chambon, C., Damon, M., Larzul, C., Leroy, P., Glenisson, J. and Cherel, P., 2007. Comparison of sarcoplasmic proteomes between two groups of pig muscles selected for shear force of cooked meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (14): 5834-5841.

Lenth, R. V., 2007. Statistical power calculations. *Journal of Animal Science* 85 24-29.

Lepetit, J., 2004. *Rôle des tissus conjonctifs dans le déterminisme de la tendreté de la viande.* In: 10èmes Journées des Sciences du Muscle et Technologies de la Viande, Clermont-Ferrand. p 15-25.

Lepetit, J., 2007. A theoretical approach of the relationships between collagen content, collagen cross-links and meat tenderness. *Meat Science* 76 (1): 147-159.

Lepetit, J. and Culioli, J., 1994. Mechanical properties of meat. *Meat Science* 36 (1-2): 203-237.

Lepetit, J. and Salé, P., 1985. Analyse du comportement rhéologique de la viande par une méthode de compression sinusoïdale. *Sciences des Aliments* 5 (4): 521-540.

Listrat, A. and Hocquette, J. F., 2004. Analytical limits of total and insoluble collagen content measurements and of type i and iii collagen analysis by electrophoresis in bovine muscles. *Meat Science* 68 (1): 127-136.

Listrat, A., Lethias, C., Hocquette, J. F., Renand, G., Menissier, F., Geay, Y. and Picard, B., 2000. Age-related changes and location of types i, iii, xii and xiv collagen during development of skeletal muscles from genetically different animals. *Histochemical Journal* 32 (6): 349-356.

Lobke, C., Laible, M., Rappl, C., Ruschhaupt, M., Sahin, O., Arlt, D., Wiemann, S., Poustka, A., Sultmann, H. and Korf, U., 2008. Contact spotting of protein microarrays coupled with spike-in of normalizer protein permits time-resolved analysis of erbb receptor signaling. *Proteomics* 8 (8): 1586-1594.

Loftus, R. T., MacHugh, D. E., Bradley, D. G., Sharp, P. M. and Cunningham, P., 1994. Evidence for two independent domestications of cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (7): 2575-2761.

-M-

MacHugh, D. E., Shriver, M. D., Loftus, R. T., Cunningham, P. and Bradley, D. G., 1997. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*bos taurus* and *bos indicus*). *Genetics* 146 (3): 1071-1086.

Maere, S., Heymans, K. and Kuiper, M., 2005. Bingo: A cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics* 21 (16): 3448-3449.

Maltin, C., Balcerzak, D., Tilley, R. and Delday, M., 2003. Determinants of meat quality: Tenderness. *Proceedings of the Nutrition Society* 62 (2): 337-347.

Maltin, C., Sinclair, K. D., Warriss, P. D., Grant, C. M., Porter, A. D., Delday, M. and Warkup, C. C., 1998. The effects of age at slaughter, genotype and finishing system on the biochemical properties, muscle fibre type characteristics and eating quality of bull beef from suckled calves. *Animal Science* 66 341-348.

Matthee, C. A. and Davis, S. K., 2001. Molecular insights into the evolution of the family bovidae: A nuclear DNA perspective. *Molecular Biology and Evolution* 18 (7): 1220-1230.

McCormick, R. J., 1999. Extracellular modifications to muscle collagen: Implications for meat quality. *Poultry Science* 78 (5): 785-791.

Micol, D. and Lherm, M., 2010. *La production de viande bovine en france. Quels types de production pour quel produit ?* Paru dans *Muscle et viande de ruminants*, Sous presse. Edité par QUAE.

Mistrello, G., Gentili, M., Falagiani, P., Roncarolo, D., Riva, G. and Tinelli, M., 1995. Dot-immunobinding assay as a new diagnostic-test for human hydatid-disease. *Immunology Letters* 47 (1-2): 79-85.

Monin, G., 1991. Facteurs biologiques des qualites de la viande bovine. *Productions Animales* 4 (2): 151-160.

Morzel, M., Gatellier, P., Sayd, T., Renerre, M. and Laville, E., 2006. Chemical oxidation decreases proteolytic susceptibility of skeletal muscle myofibrillar proteins. *Meat Science* 73 (3): 536-543.

Morzel, M., Terlouw, C., Chambon, C., Micol, D. and Picard, B., 2008. Muscle proteome and meat eating qualities of longissimus thoracis of "Blonde d'aquitaine" Young bulls: A central role of hsp27 isoforms. *Meat Science* 78 (3): 297-304.

-N-

Nakanishi, K., Maruyama, M., Shibata, T. and Morishima, N., 2001. Identification of a caspase-9 substrate and detection of its cleavage in programmed cell death during mouse development. *Journal of Biological Chemistry* 276 (44): 41237-41244.

-O-

Obermann, W. M. J., Gautel, M., Steiner, F., vanderVen, P. F. M., Weber, K. and Furst, D. O., 1996. The structure of the sarcomeric m band: Localization of defined domains of myomesin, m-protein, and the 250-kd carboxy-terminal region of titin by immunoelectron microscopy. *Journal of Cell Biology* 134 (6): 1441-1453.

Otremba, M. M., Dikeman, M. E., Milliken, G. A., Stroda, S. L., Unruh, J. A. and Chambers, E. t., 1999. Interrelationships among evaluations of beef longissimus and semitendinosus muscle tenderness by warner-bratzler shear force, a descriptive-texture profile sensory panel, and a descriptive attribute sensory panel. *Journal of Animal Science* 77 (4): 865-873.

Ouali, A., 1991. Conséquences des traitements technologiques sur la qualité de la viande. *Productions Animales* 4 (3): 195-208.

Ouali, A., Herrera-Mendez, C. H., Coulis, G., Becila, S., Boudjellal, A., Aubry, L. and Sentandreu, M. A., 2006. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Science* 74 (1): 44-58.

Ouali, A. and Talmant, A., 1990. Calpains and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal muscles. *Meat Science* 28 (4): 331-348.

-P-

Page, B. T., Casas, E., Heaton, M. P., Cullen, N. G., Hyndman, D. L., Morris, C. A., Crawford, A. M., Wheeler, T. L., Koohmaraie, M., Keele, J. W. and Smith, T. P. L., 2002. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in capn1 for association with meat tenderness in cattle. *Journal of Animal Science* 80 (12): 3077-3085.

Page, B. T., Casas, E., Quaas, R. L., Thallman, R. M., Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., Koohmaraie, M., White, S. N., Bennett, G. L., Keele, J. W., Dikeman, M. E. and Smith, T. P. L., 2004. Association of markers in the bovine capn1 gene with meat

tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. *Journal of Animal Science* 82 (12): 3474-3481.

Peachey, B. M., Purchas, R. W. and Duizer, L. M., 2002. Relationships between sensory and objective measures of meat tenderness of beef m. Longissimus thoracis from bulls and steers. *Meat Science* 60 (3): 211-218.

Peter, J. B., Barnard, R. J., Edgerton, V. R., Gillespie, C. A. and Stempel, K. E., 1972. Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry* 11 (14): 2627-2633.

Picard, B., Berri, C., Lefaucheur, L., Molette, C., Sayd, T. and Terlouw, C., 2010. Skeletal muscle proteomics in livestock production. *Briefings in Functional Genomics* 9 (3): 259-278.

Picard, B. and Cassar-Malek, I., 2009. Evidence for expression of iib myosin heavy chain isoform in some skeletal muscles of blonde d'aquitaine bulls. *Meat Science* 82 (1): 30-36.

Picard, B., Jurie, C., Bauchart, D., Dransfield, E., Ouali, A., Martin, J. F., Jailer, R., Lepetit, J. and Culioli, J., 2007. Caractéristiques des muscles et de la viande des principales races bovines allaitantes du massif central. *Sciences des Aliments* 27/2 168-180.

Picard, B., Jurie, C., Duris, M. P. and Renand, G., 2006. Consequences of selection for higher growth rate on muscle fibre development in cattle. *Livestock Science* 102 (1-2): 107-120.

Picard, B., Lefaucheur, L., Berri, C. and Duclos, M. J., 2002. Muscle fibre ontogenesis in farm animal species. *Reproduction Nutrition Development* 42 (5): 415-431.

Picard, B., Lefaucheur, L., Fauconneau, B., Rémignon, H., Cherel, Y., Barrey, E., Nédelec, J. and Noé, I. N.-I. n. d. l. r. a.-G., 1998. Caractérisation des différents types de fibres musculaires dans plusieurs espèces : Production et utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre les chaînes lourdes de myosine rapide iia et iib. *Productions Animales* 11 (2): 145-146.

Piot, C., Veerkamp, J. H., Bauchart, D. and Hocquette, J. F., 1998. Contribution of mitochondria and peroxisomes to palmitate oxidation in rat and bovine tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 121 (2): 185-194.

Powers, S. K., Kavazis, A. N. and McClung, J. M., 2007. Oxidative stress and disuse muscle atrophy. *Journal of Applied Physiology* 102 (6): 2389-2397.

-R-

Renand, G., Jurie, C., Robelin, J., Picard, B., Geay, Y. and Menissier, F., 1995. Genetic-variability of muscle biological characteristics of young limousin bulls. *Genetics Selection Evolution* 27 (3): 287-298.

Renand, G., Levéziel, H., Payet, N., Hocquette, J. F., Lepetit, J., Denoyelle, C., Dodelin, V. and Malafosse, A., 2006. *Qualités des carcasses et des viandes de jeunes bovins charolais hétérozygotes pour la mutation q204x de la myostatine.* In: 11èmes Journées Sciences du Muscle et Technologie des Viande, Clermont-Ferrand

Renand, G., Picard, B., Touraille, C., Berge, P. and Lepetit, J., 2001. Relationships between muscle characteristics and meat quality traits of young charolais bulls. *Meat Science* 59 (1): 49-60.

Renand, G., Touraille, C., Geay, Y., Berge, P., Lepetit, J. and Picard, B., 1997. *Variabilité des qualités organoleptiques de la viande bovine en relation avec les caractéristiques musculaires.* In: 4ème Rencontres autour des recherches sur les ruminants, Paris (FRA). p 311-314.

Rhee, M. S., Wheeler, T. L., Shackelford, S. D. and Koohmaraie, M., 2004. Variation in palatability and biochemical traits within and among eleven beef muscles. *Journal of Animal Science* 82 (2): 534-550.

-S-

Sawdy, J. C., Kaiser, S. A., St-Pierre, N. R. and Wick, M. P., 2004. Myofibrillar 1-d fingerprints and myosin heavy chain ms analyses of beef loin at 36 h postmortem correlate with tenderness at 7 days. *Meat Science* 67 (3): 421-426.

Schenkel, F. S., Miller, S. P., Jiang, Z., Mandell, I. B., Ye, X., Li, H. and Wilton, J. W., 2006. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *Journal of Animal Science* 84 (2): 291-299.

Schibler, L., Vaiman, D. and Cribiu, E. P., 2000. Origine du polymorphisme de l'adn. *INRA Productions Animales Hors-série Génétique moléculaire* 37-43.

Schoenauer, R., Bertoncini, P., Machaidze, G., Aebi, U., Perriard, J. C., Hegner, M. and Agarkova, I., 2005. Myomesin is a molecular spring with adaptable elasticity. *Journal of Molecular Biology* 349 (2): 367-379.

Schreurs, N. M., Garcia, F., Jurie, C., Agabriel, J., Micol, D., Bauchart, D., Listrat, A. and Picard, B., 2008. Meta-analysis of the effect of animal maturity on muscle characteristics in different muscles, breeds, and sexes of cattle. *Journal of Animal Science* 86 (11): 2872-2887.

Sentandreu, M. A., Coulis, G. and Ouali, A., 2002. Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends in Food Science & Technology* 13 (12): 400-421.

Shackelford, S. D., Wheeler, T. L. and Koohmaraie, M., 1999. Evaluation of slice shear force as an objective method of assessing beef longissimus tenderness. *Journal of Animal Science* 77 (10): 2693-2699.

Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B. and Ideker, T., 2003. Cytoscape: A software environment for

integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research* 13 (11): 2498-2504.

Strydom, P. E., Naude, R. T., Smith, M. F., Scholtz, M. M. and van Wyk, J. B., 2000. Characterisation of indigenous african cattle breeds in relation to meat quality traits. *Meat Science* 55 (1): 79-88.

Sudre, K., Leroux, C., Cassar-Malek, I., Hocquette, J. F. and Martin, P., 2005. A collection of bovine cdna probes for gene expression profiling in muscle. *Molecular and Cellular Probes* 19 (1): 61-70.

Sun, Y. and MacRae, T. H., 2005. Small heat shock proteins: Molecular structure and chaperone function. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62 (21): 2460-2476.

-T-

Tarcea, V. G., Weymouth, T., Ade, A., Bookvich, A., Gao, J., Mahavisno, V., Wright, Z., Chapman, A., Jayapandian, M., Oezguer, A., Tian, Y. Y., Cavalcoti, J., Mirel, B., Patel, J., Radev, D., Athey, B., States, D. and Jagadish, H. V., 2009. Michigan molecular interactions r2: From interacting proteins to pathways. *Nucleic Acids Research* 37 D642-D646.

Taylor, R. C., Cullen, S. P. and Martin, S. J., 2008. Apoptosis: Controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (3): 231-241.

Touraille, C., 1994. *Incidence des caractéristiques musculaires sur les qualités organoleptiques des viandes*. In: Rencontre Recherches Ruminants, Paris

-V-

Van Eenennaam, A. L., Li, J., Thallman, R. M., Quaas, R. L., Dikeman, M. E., Gill, C. A., Franke, D. E. and Thomas, M. G., 2007. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. *Journal of Animal Science* 85 (4): 891-900.

Verkaar, E. L. C., Nijman, I. J., Beeke, M., Hanekamp, E. and Lenstra, J. A., 2004. Maternal and paternal lineages in cross-breeding bovine species has wisent a hybrid origin? *Molecular Biology and Evolution* 21 (7): 1165-1170.

Vicart, P., Caron, A., Guicheney, P., Li, Z. L., Prevost, M. C., Faure, A., Chateau, D., Chapon, F., Tome, F., Dupret, J. M., Paulin, D. and Fardeau, M., 1998. A missense mutation in the alpha b-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nature Genetics* 20 (1): 92-95.

Vilà, C., Seddon, J. and Ellegren, H., 2005. Genes of domestic mammals augmented by backcrossing with wild ancestors. *Trends in Genetics* 21 (4): 214-218.

-W-

Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., Johnson, L. P., Miller, M. F., Miller, R. K. and Koohmaraie, M., 1997. A comparison of warner-bratzler shear force assessment within and among institutions. *Journal of Animal Science* 75 (9): 2423-2432.

Wheeler, T. L., Shackelford, S. D. and Koohmaraie, M., 1998. Cooking and palatability traits of beef longissimus steaks cooked with a belt grill or an open hearth electric broiler. *Journal of Animal Science* 76 (11): 2805-2810.

Wheeler, T. L., Shackelford, S. D. and Koohmaraie, M., 2004. The accuracy and repeatability of untrained laboratory consumer panelists in detecting differences in beef longissimus tenderness. *Journal of Animal Science* 82 (2): 557-562.

Whipple, G., Koohmaraie, M., Dikeman, M. E., Crouse, J. D., Hunt, M. C. and Klemm, R. D., 1990. Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in bos taurus and bos indicus cattle. *Journal of Animal Science* 68 (9): 2716-2728.

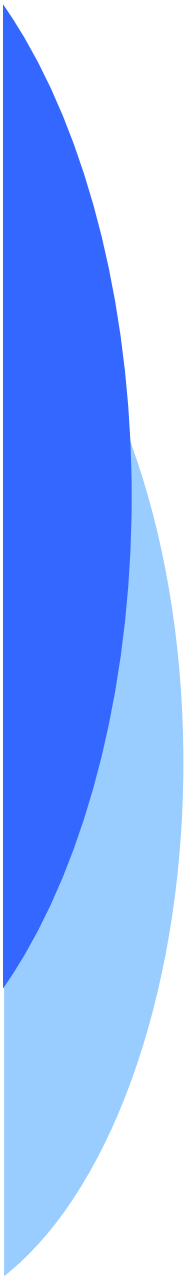
White, S. N., Casas, E., Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., Koohmaraie, M., Riley, D. G., Chase, C. C., Jr., Johnson, D. D., Keele, J. W. and Smith, T. P. L., 2005. A new single nucleotide polymorphism in capn1 extends the current tenderness marker test to include cattle of bos indicus, bos taurus, and crossbred descent. *Journal of Animal Science* 83 (9): 2001-2008.

Wilson, D. S. and Nock, S., 2002. Functional protein microarrays. *Current Opinion in Chemical Biology* 6 (1): 81-85.

-Y/Z-

Young, J. C., Agashe, V. R., Siegers, K. and Hartl, F. U., 2004. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5 (10): 781-791.

Zamora, F., Debiton, E., Lepetit, J., Lebert, A., Dransfield, E. and Ouali, A., 1996. Predicting variability of ageing and toughness in beef m. Longissimus lumborum et thoracis. *Meat Science* 43 (3-4): 321-333.



Annexes

La maîtrise de la tendreté de la viande bovine : identification de marqueurs biologiques

N. GUILLEMIN¹, I. CASSAR-MALEK¹, J.-F. HOCQUETTE¹, C. JURIE¹, D. MICOL¹, A. LISTRAT¹,
H. LEVEZIEL², G. RENAND³, B. PICARD¹

¹ INRA, UR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès Champanelle, France

² INRA, Université de Limoges, Faculté des Sciences, UMR1061 Génétique Moléculaire Animale,
F-87060 Limoges, France

³ INRA, UMR1313, Génétique Animale et Biologie Intégrative, F-78352 Jouy-en-Josas, France

Courriel : picard@clermont.inra.fr

La tendreté de la viande bovine présente une variabilité forte et non contrôlée. En l'absence de tests de prédiction, des marqueurs génomiques de la tendreté ont été identifiés à la demande des représentants de la filière bovine. Ils ouvrent de nouvelles perspectives pour comprendre et maîtriser ce critère de qualité sensorielle majeur pour le consommateur.

Entre 1997 et 2007, la consommation mondiale de viande toutes espèces confondues est passée de 143 à 271 millions de tonnes équivalent carcasses. Elle a donc pratiquement doublé en 15 ans avec un taux de croissance annuel moyen de 5% sur cette période (Mainsant 2003). Cette augmentation a essentiellement profité aux monogastriques, la part de la viande bovine ayant chuté de 29 à 24% entre 1990 et 2007 au niveau mondial. Cette chute est surtout observée en Europe, alors que la consommation de viande bovine a fortement progressé en Chine et au Brésil et qu'elle a continué d'augmenter aux Etats-Unis au cours des 17 dernières années. En Europe, la baisse de consommation a surtout concerné des pays traditionnellement consommateurs de viande bovine comme l'Allemagne, l'Italie et la France. En France, la viande bovine (hors veau) représente en 2008 une consommation de 21,2 kg équivalent carcasse par personne et par an, ce qui constitue une baisse de 2,5% par rapport à 2007 (Depeyrot *et al* 2008). La viande de bovins représente 24% de la consommation totale de viande. Mis à part la concurrence des viandes de monogastriques et les effets des deux crises successives d'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB), la moindre

consommation de viande bovine par rapport aux autres types de viande s'explique, en plus de son coût élevé, par la variabilité forte et non maîtrisée de sa tendreté (Maltin *et al* 2003).

Dans la filière bovine, la tendreté a été définie comme le descripteur sensoriel le plus important (Savell *et al* 1987). Ainsi, si pour les 10% de consommateurs susceptibles d'être considérés comme des gastronomes, la qualité organoleptique est à prendre en considération dans son ensemble, pour 90% des consommateurs il y a lieu d'apprécier surtout la tendreté (Craplet 1966). Il est ainsi communément admis que la tendreté de la viande constitue le critère de qualité sensorielle le plus important pour le consommateur.

Malgré les efforts pour contrôler et optimiser la gestion des périodes de finition et d'abattage, dont on connaît l'influence non négligeable sur la tendreté (Oury *et al* 2007), il demeure une variabilité inacceptable de cette qualité. Ceci suggère que les déterminants de la qualité sont à la fois multifactoriels et complexes (Maltin *et al* 2003). Afin d'identifier précisément ces déterminants, les chercheurs et les représentants de la filière bovine ont mis en

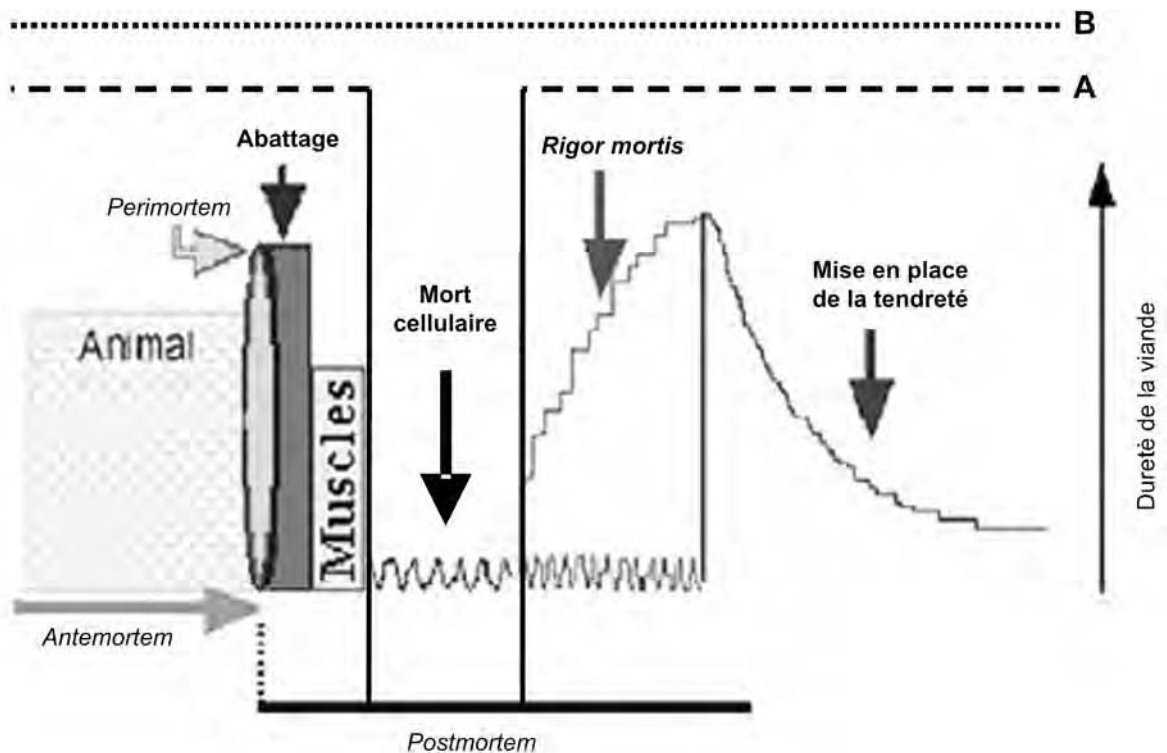
œuvre au cours des dernières années plusieurs programmes de recherches dont le projet MUGENE (Hocquette *et al* 2007b) dans le cadre du programme national AGENAE financé dans l'appel d'offre GENANIMAL de l'ANR (Chevalet *et al* 2007). Ces programmes qui associent des analyses génétiques, génomiques et phénotypiques, laissent envisager de grandes avancées dans la connaissance et la maîtrise de la tendreté de la viande bovine.

La présente synthèse a pour objectif de faire le point sur l'état des connaissances sur les caractéristiques musculaires reliées à la tendreté et les marqueurs biologiques de la tendreté de la viande révélés par les études de transcriptomique et protéomique.

1 / La tendreté

La tendreté est considérée comme une propriété organoleptique qui traduit la facilité avec laquelle la structure de la viande peut être désorganisée au cours de la mastication (Ouali *et al* 2006). A l'opposé, la dureté de la viande exprime la résistance qu'elle offre au tranchage ou à la mastication.

Figure 1. Les différentes phases de l'évolution de la dureté du muscle au cours du temps après l'abattage. Adapté de Ouali A. (1991 et 2006).



A. Vision en 1991

L'impact de la mort cellulaire dans la mise en place de la tendreté n'est pas encore évoqué.

B. Vision en 2006

L'étape précoce de la mort cellulaire a un rôle prépondérant dans la mise en place de la tendreté alors que les systèmes protéolytiques connus ne fonctionnent pas encore.

La tendreté évolue au cours de la transformation du muscle en viande (figure 1A) (Ouali 1991). En effet, les changements post mortem qui se mettent en place à la mort de l'animal ont une grande importance dans l'évolution de la tendreté. Les cellules musculaires cherchent à maintenir leur homéostasie, par l'utilisation des molécules d'Adénosine TriPhosphate (ATP). L'hydrolyse de l'ATP libère un proton H^+ provoquant une acidification des cellules jusqu'à un pH de 5,4-5,7 (Bendall 1973). Afin de régénérer les molécules d'ATP par phosphorylation de l'Adénosine DiPhosphate (ADP), les cellules métabolisent le glycogène, ce qui entraîne une production d'acide lactique. Dans le milieu cellulaire, cet acide libère son proton H^+ pour se transformer en lactate suite à la fixation d'ions sodium Na^+ . Cette libération de protons contribue à l'acidification des cellules, dont l'effet sur le pH est minime comparativement à l'apport de l'hydrolyse de l'ATP. La baisse d'ATP inhibe les ATPases sarcoplasmiques, ce qui mène à la fuite des ions calcium Ca^{2+} dans le réticulum. Les réserves d'ATP n'étant plus suffisantes pour assurer la relaxation, les têtes de myo-

sine ne se détachent plus des filaments d'actine, ce qui se traduit par une perte d'élasticité du muscle. C'est la rigidité cadavérique, ou *rigor mortis*. Le développement de celle-ci se poursuit jusqu'à 9 h après abattage, pour être complet 12 à 24 h post mortem. La dureté de la viande est alors maximale. Le développement de la *rigor mortis* peut être accéléré par une stimulation électrique de la carcasse (Savell et al 2005). La résolution de la dureté liée à l'installation de la *rigor mortis* se réalise progressivement grâce au processus de maturation. La maturation est la résultante de l'action des protéases musculaires, et ce dès l'abattage de l'animal, mais dont les effets sont masqués durant les premières 48 h par la *rigor mortis*. Les systèmes protéolytiques dégradent les protéines myofibrillaires et du cytosquelette. Ils rompent ainsi les liens inter- et intra- myofibrilles, les liaisons myofibrille/sarcolemme, et l'attachement des cellules musculaires à la lame basale. Il s'agit d'une protéolyse ménagée qui détend progressivement le muscle, ayant pour conséquence l'établissement d'une valeur de tendreté maximale de la viande. Le collagène n'étant pas ou très peu affecté

par ces protéases, la teneur en collagène du muscle définit une dureté de base qui limite la tendreté maximale de la viande crue ou peu cuite. Dans le cas de viandes présentant des cuissons longues et à température élevée, le rôle du tissu conjonctif dans la dureté de base devient négligeable, en raison de la solubilisation du collagène. Cette dureté de base va alors dépendre des propriétés des myofibrilles. Le processus de protéolyse des protéines myofibrillaires est un phénomène clé dans l'établissement de la tendreté. Il est variable d'un muscle à l'autre et d'un animal à un autre. Cette protéolyse peut être modulée par l'oxydation des protéines, les protéines oxydées formant des agrégats moins sensibles aux protéases (Morzel et al 2006).

Afin d'étudier la tendreté des viandes, encore faut-il pouvoir l'évaluer avec objectivité. De nombreux tests mécaniques sont disponibles pour mesurer la dureté de la viande, par exemple : le test de cisaillement, le test de compression, de tension, de morsure, la pénétrométrie, et le découpage par lames multiples (Lepetit et Culioli 1994).

A partir de viande crue, la tendreté peut être évaluée par des mesures de compression longitudinale, qui correspondent à l'application d'une déformation perpendiculairement aux fibres musculaires avec une limitation de la déformation libre de la viande au seul axe parallèle aux myofibrilles. L'échantillon se déforme alors librement dans le sens des fibres musculaires et la mesure de compression exprime leur résistance, qui diminue au cours de la maturation de la viande. A 20% de déformation, les fibres de collagène n'étant pas totalement dépliées, leur résistance n'est pas mise en jeu. Plus la déformation augmente, plus le nombre de fibres conjonctives sollicitées augmente, et ce, jusqu'au taux de déformation critique où l'ensemble des fibres est en tension, donnant à la viande une élasticité maximale (Lepetit et Culioli 1994). La mesure de la force de compression à 20% de déformation donne donc une indication sur le degré de maturation du morceau considéré alors qu'aux fortes valeurs de déformation, elle dépend également de la teneur et de l'état du collagène.

La force de cisaillement mesure la contrainte nécessaire pour faire passer une arête tranchante à travers un morceau de viande perpendiculairement aux fibres musculaires. Déterminée sur une viande crue maturée, elle correspond avec une très bonne approximation, à la résistance du tissu conjonctif. Le pic obtenu lors de la mesure avec l'appareil de Salé (Lepetit et Salé 1985) ou avec l'appareil de Warner-Bratzler, le plus répandu, correspond à la valeur de la force maximale nécessaire au cisaillement de l'échantillon (Wheeler *et al* 1997). Le test de Warner-Bratzler est surtout employé sur de la viande maturée cuite pour déterminer une note de dureté mécanique. L'utilisation de la viande cuite permet de se rapprocher des attentes des consommateurs. La répétabilité de tels tests mécaniques est affectée par la préparation et la cuisson des échantillons analysés. La tendreté de la viande est la résultante de nombreux facteurs, et donc son évaluation ne peut être réduite à ce seul paramètre mécanique. C'est pourquoi dans de nombreuses études, le test sensoriel, faisant intervenir un jury de dégustateurs entraînés à juger de la qualité des viandes dont la tendreté, est préférentiellement employé. L'évaluation de la tendreté effectuée par ces tests dans différentes équipes est à nuancer en fonction de la préparation des échantillons. Selon les pays, les échantillons étudiés sont cuits avec une température à cœur

de 55-60°C en France (Dransfield *et al* 2003) et à 70°C aux USA (Wheeler *et al* 1998) et au Royaume-Uni. L'analyse sensorielle est la méthode la plus directe d'évaluation de la tendreté de la viande. Malgré les contraintes qu'elle implique (nombre de juges, quantité de viande à tester, coût élevé, répétabilité moyenne), elle est considérée comme la méthode de référence, à laquelle les méthodes instrumentales sont comparées.

De nombreuses corrélations ont ainsi été mises en évidence entre les résultats obtenus par les mesures mécaniques et sensorielles sur viande cuite. Les corrélations entre tendreté et force de cisaillement (appareil de Warner-Bratzler) sont évidemment négatives, - 0,60 en moyenne, allant de - 0,26 à - 0,95 (Whipple *et al* 1990, Shackelford *et al* 1999, Silva *et al* 1999, Chambaz *et al* 2003, Lorenzen *et al* 2003, Rhee *et al* 2004, Wheeler *et al* 2004).

Les nombreuses recherches conduites durant ces dernières années ont bien montré que la variabilité de la tendreté pour un muscle donné est la conséquence d'une part de facteurs propres à l'animal (race, sexe, âge) et à ses conditions de production (Hocquette *et al* 2005), et d'autre part aux conditions d'abattage et de maturation de la viande (Got *et al* 1999). Les qualités sensorielles, dont la tendreté, dépendent de la composition et des propriétés structurales du muscle. Dans une première partie, les facteurs physiologiques et biochimiques (collagène, lipides, protéases, et fibres musculaires) seront présentés, puis dans une seconde partie les facteurs transcriptomiques et protéomiques.

2 / Caractéristiques musculaires liées à la tendreté

2.1 / Le collagène

La trame conjonctive est constituée essentiellement de collagène, protéine qui par sa teneur, sa nature et sa solubilité dans l'eau et à la chaleur, est un facteur déterminant de la tendreté de la viande (Lepetit 2004). Etant peu affectée par l'action des protéases durant la maturation, la teneur en collagène définit la dureté de base de la viande crue ou peu cuite. L'étude de Renand *et al* (1997) rappelle que le collagène intervient à la fois négativement dans la tendreté par sa teneur, et positivement par sa solubilité. C'est sur la base des caractéristiques du collagène dans les muscles que sont classées les trois caté-

gories de morceaux de la carcasse : à bouillir, à braiser, à rôtir ou à griller. Toutefois, l'impact du collagène sur la tendreté dépend de la température de cuisson de la viande. La solubilité du collagène augmentant avec la température, sa relation avec la tendreté est moindre dans les études nord-américaines où la viande est cuite à une température de 70°C, supérieure à celle des études françaises (55°C) (Renand *et al* 2001).

En effet, lorsqu'il est chauffé, le collagène se contracte et se dénature aux alentours de 58-65°C pour se transformer en gélatine insoluble, par rupture des liaisons intramoléculaires d'abord, puis des liaisons intermoléculaires si la cuisson s'intensifie (Lepetit 2004). Quelques différences existent dans la température de dénaturation entre les différents types de collagène. En conséquence, les morceaux contenant beaucoup de collagène nécessitent une durée et une température de cuisson plus élevées afin de transformer le collagène en gélatine. A l'inverse, des morceaux pauvres en collagène peuvent être cuits rapidement. La solubilité du collagène dépend de ses propriétés (nombre et types de liaisons intra et inter-chaînes de collagènes et types de collagène).

Ainsi, les muscles les moins tendres, comme le *Semimembranosus*, présentent une concentration en collagène (3%) et un nombre de liaisons pyridinium élevés (McCormick 1999). A l'inverse, un muscle tendre comme le *Longissimus thoracis* présente une concentration en collagène (1,86%) et un nombre de liaisons pyridinium plus faibles. Mais certains muscles comme le *Gluteus medius* ont beaucoup de collagène (2,77%) et peu de liaisons pyridinium. A l'inverse, le muscle *Psoas major* a peu de collagène (1,41%) et beaucoup de liaisons pyridinium. Pourtant, ces deux muscles présentent une tendreté équivalente. Il en a été conclu que la concentration en collagène, mais également le nombre de liaisons pyrimidium, ont un effet additif négatif sur la tendreté (McCormick 1999). Le type de collagène joue aussi un rôle dans la tendreté. En particulier, le collagène de type III, sensible aux protéases, est relié à la tendreté (Monin 1991). Les types de collagène XII et XIV diminueraient la solubilité du collagène total (Listrat *et al* 2000), et donc la tendreté. Ces deux types de collagène dits «mineurs» joueraient un rôle important dans les propriétés physiologiques du collagène.

Cependant, il est difficile de déterminer précisément la part du collagène dans la tendreté car deux muscles présentant une teneur, composition et solubilité identique en collagène peuvent avoir des tendretés différentes. En effet, la contraction des fibres musculaires, s'opposant à la contraction du collagène, diminue la résistance mécanique de ce dernier (Lepetit 2004).

2.2 / Les lipides

Les lipides sont présents sous la forme de triglycérides (esters de glycérol et d'acides gras pouvant être saturés, monoinsaturés et polyinsaturés) majoritaires et de phospholipides (lipides membranaires insaturés) (Bauchart *et al* 1996). L'étude de Touraille (1994) montre que la teneur en lipides intramusculaires joue un rôle essentiel dans la jutosité et la flaveur mais a un moindre impact sur la tendreté de la viande. Les résultats bibliographiques concernant la relation entre teneur en lipides et tendreté mesurées sur un même muscle sont contradictoires. Certains auteurs ne trouvent aucune corrélation sur viande crue et cuite (Geay *et al* 2001). Au contraire, d'autres études françaises ont montré qu'il existe une corrélation positive entre la teneur en lipides et la tendreté, comme celle de Picard *et al* (2007) ($r = + 0,23$) et Renand *et al* (1997) ($r = + 0,19$). La présence d'adipocytes abaisserait la dureté d'un muscle en produisant un effet lubrificateur durant la mastication, ce qui rehausserait la sensation de tendreté perçue par le consommateur (Renand *et al* 2001). A noter que dans les études anglo-saxonnes, la relation entre le persillé de la viande (et donc la teneur en lipides intramusculaires) avec la tendreté est plus nette (Wheeler *et al* 1994) notamment en raison de teneurs en lipides intramusculaires plus élevées qu'en France.

Enfin, on pourrait supposer que la couche lipidique des muscles prévient le phénomène de contracture au froid et donc serait favorable à la tendreté. Toutefois, Geay et Renand (1994) observent une corrélation génétique positive ($r = + 0,21$) entre l'adiposité des carcasses de taurillons et la dureté de la viande crue.

Il faut noter que le persillage de la viande est un critère retenu dans le système MSA (*Meat Standards Australia*) de prédiction de la palatabilité (ensemble des caractéristiques sensorielles agréables au palais) de la viande (Thompson et Polkinghorne 2008).

2.3 / Les systèmes protéolytiques

La maturation de la viande est un processus très complexe affectant principalement la structure myofibrillaire et dépendant de plusieurs facteurs ante- et post mortem. C'est un processus essentiellement enzymatique (Ouali 1992). Il résulte de l'action des protéases endogènes sur les protéines contractiles et sur les constituants du cytosquelette (Huff-Lonergan et Lonergan 1999). Les systèmes protéolytiques identifiés dans le muscle comprennent les calpaïnes, les cathepsines, le protéasome, les métallopeptidases (Matrix Metallopeptidases ou MMP's) et les sérine peptidases (Ouali *et al* 2006). Deux d'entre eux ont été particulièrement étudiés. Il s'agit des calpaïnes (Goll *et al* 2003) et des cathepsines (Ouali 1992). Une contribution significative de la sous-unité 20S du protéasome au processus de maturation a été mise en évidence plus récemment (Dutaud *et al* 2006). Par ailleurs, certains résultats indiquent clairement que le taux d'inhibiteurs spécifiques de ces systèmes protéolytiques constitue un meilleur indicateur du processus d'attendrissement que le taux des enzymes elles-mêmes (Ouali et Talmant 1990). Récemment Ouali *et al* (2006) ont proposé un nouveau concept impliquant des enzymes de la famille des caspases ayant également un rôle important dans les processus d'apoptose (mort cellulaire programmée). Ces derniers pourraient constituer une première étape du phénomène de maturation.

a) Les calpaïnes

Ce sont des protéases à cystéine calcium-dépendantes, formant un groupe de peptidases intracellulaires (Goll *et al* 2003). Les calpaïnes les plus étudiées sont la μ -calpaïne (active à des concentrations en calcium de l'ordre du μM), et la m-calpaïne (active à des concentrations en calcium de l'ordre du mM).

L'activité des calpaïnes est régulée par les ions calcium Ca^{2+} , les phospholipides, et leurs inhibiteurs spécifiques, les calpastatines. Ce sont des protéines polymorphes qui comprennent 4 domaines. Chacun d'entre eux possède une activité inhibitrice sur une calpaïne. Les différentes isoformes sont les résultantes de mécanismes d'épissage alternatif, de phosphorylation, et de transcription/traduction initiés à différents sites. Ainsi, la forme phosphorylée de la calpastatine est majoritairement présente dans les fibres lentes, et est minoritaire dans les fibres rapides. La calpastatine agit comme un inhibi-

teur compétitif sur les calpaïnes en se fixant sur les sous-unités régulatrices et catalytiques, sous la dépendance des ions calcium (Dargelos *et al* 2008).

Plusieurs études ont montré que la dégradation des disques Z, réaction associée à la tendreté, est due à l'activité des calpaïnes. Certains auteurs n'hésitent pas à rendre les calpaïnes responsables de 95% de l'activité protéolytique totale lors de la mise en place de la tendreté (Koohmaraie et Geesink 2006). Ainsi, le système protéolytique calcium-dépendant serait un bon marqueur de la tendreté de la viande, et plus précisément le rapport calpaïne/calpastatine.

Récemment, une étude de Houbak *et al* (2008) a remis en question le rôle essentiel des calpaïnes dans la mise en place de la tendreté. En effet, l'inhibition des calpaïnes a un effet mineur sur le profil de dégradation protéique. De même, la calpastatine n'a pas été retenue comme variable significative dans un modèle de tendreté développé par Zamora *et al* (2005).

b) Les cathepsines

Les cathepsines sont des protéases lysosomiales actives à pH acide (de 3 à 6,5). Elles forment un groupe complexe incluant des exo- et endo-peptidases (Sentandreu *et al* 2002). Plusieurs familles peuvent être distinguées : les protéases à cystéine (cathepsines B, H, L...), à acide aspartique (cathepsines D et E), et sérine (cathepsine G). Leur activité est contrôlée par le pH et leurs inhibiteurs spécifiques, les cystatines. Celles-ci forment un groupe d'inhibiteurs de protéases à cystéine.

Le rôle des cathepsines dans la mise en place de la tendreté est sujet à controverse. En effet, l'activité de ces enzymes ne permet pas d'expliquer la variabilité de la tendreté, contrairement à celle des calpaïnes. De plus, les cathepsines sont contenues dans le lysosome et n'ont pas accès aux protéines myofibrillaires. Toutefois, certaines études ont montré qu'après une maturation de 14 jours, la membrane du lysosome se rompt progressivement, libérant les cathepsines. Ainsi, la fraction cytoplasmique est enrichie de ces enzymes. La présence des cystatines dans le cytoplasme inhibe l'activité des cathepsines ainsi libérées, c'est pourquoi le rapport cathepsines/cystatines serait un bon indice de l'activité de ces enzymes. L'activité de certaines cathepsines, comme les B, H et L, serait corrélée à la tendreté. Des incubations de fibres

musculaires dans des extraits de lysosomes ont montré que l'actine et la myosine sont partiellement dégradées au bout de 7 à 10 jours post mortem. Ainsi, tout comme le rapport calpaïne/calpastatine, le rapport cathepsines/cystatine pourrait constituer un marqueur de la tendreté. L'étude de Thomas *et al* (2004) a montré un rôle des cathepsines D, B, L et H dans la mise en place de la tendreté. D'une manière plus générale, les changements de la structure myofibrillaire lors de la protéolyse ne peuvent être expliqués par un seul système protéolytique. C'est pourquoi une action synergique des calpaïnes et des cathepsines est envisagée lors de la phase de maturation.

c) La sous-unité 20S du protéasome

Le protéasome 20S est un complexe de 700 kDa, une structure cylindrique constituée de 4 anneaux. Il possède plusieurs activités catalytiques : une activité chymotrypsine, trypsine et peptidyl-glutamyle (Sentandreu *et al* 2002). Dans la cellule, le protéasome 20S est soit sous forme libre, soit associé avec de grands complexes régulateurs. De nombreux polymorphismes du protéasome 20S existent et les isoformes sont différemment distribuées dans tous les tissus et sont retrouvées chez tous les mammifères. La régulation du complexe est assurée par des activateurs et des inhibiteurs. Certains activateurs, comme PA700 ou PA28, sont bien caractérisés, contrairement aux inhibiteurs. Un pH acide diminue l'activité du protéasome 20S.

Le protéasome 20S dégraderait plus précisément la troponine C et les chaînes légères de myosine. Sa concentration dans les fibres oxydatives est plus importante que dans les fibres glycolytiques (Dutaud *et al* 2006).

L'inhibition de l'activité du protéasome a pour conséquence une absence de dégradation d'actine, de nébuline, de chaînes légères de myosine, et de troponine T (Houbak *et al* 2008). Or, la dégradation de ces protéines est associée à la mise en place de la tendreté. Ainsi, l'étude de Thomas *et al* (2004) sur la viande d'autruche conclut que l'activité du protéasome a un rôle dans la résolution de la dureté liée à la *rigor mortis*.

d) Les peptidases à sérine

Elles forment un grand groupe d'enzymes protéolytiques dont les plus connues sont les peptidases digestives (trypsine, chymotrypsine) et les throm-

bines, plasmines (Sentandreu *et al* 2002). La présence de peptidases à sérine a été rapportée dans les muscles squelettiques et celles-ci auraient un rôle dans la régulation du métabolisme des cellules musculaires et l'homéostasie. Des peptidases à sérine sont présentes également dans la matrice extracellulaire. Les inhibiteurs de peptidases à sérine forment une famille complexe dont la plus importante est la famille des serpinines, acronyme pour inhibiteurs de protéases à sérine. Les serpinines régulent des mécanismes comme la coagulation, l'apoptose et l'inflammation. Ces inhibiteurs ont été intégrés dans des modèles de prédiction de la tendreté (Zamora *et al* 2005).

La présence des différents types de protéases à sérine est complexe à détecter. Leur rôle dans la mise en place de la tendreté reste encore à préciser.

e) La matrice metallopeptidase (MMPs)

Les MMPs forment une grande famille de metalloendopeptidases à zinc, impliquées dans le catabolisme du tissu conjonctif. Dix-huit MMPs, d'un poids moléculaire allant de 25 à 75 kDa ont été identifiées (Sentandreu *et al* 2002). Elles jouent un rôle important dans l'embryogenèse et dans la formation des tissus, et interviennent dans de nombreuses maladies. Les MMPs et leurs inhibiteurs auraient un rôle dans l'apoptose. Chacune de ces MMPs a une fonction spécifique, en particulier envers un substrat collagénique. L'activité de ces MMPs est contrôlée par l'activation de leurs précurseurs et par l'interaction avec leurs inhibiteurs. Il existe plusieurs isoformes d'inhibiteurs de MMPs, ayant plusieurs degrés de glycosylation. L'expression des MMPs et de leurs inhibiteurs serait dépendante du type de fibre. Leur fonction précise dans la dégradation du tissu conjonctif est encore inconnue, mais les MMPs sont capables de dégrader les fibres de collagène (Balcerzak *et al* 2001).

Etant donné que le collagène ne subit que peu de changements durant la maturation, les MMPs ont été peu étudiées dans le cadre des sciences de la viande. Cependant, d'autres constituants de la matrice extracellulaire des fibres musculaires, comme les laminines, fibronectines et dystroglycannes, pourraient être affectés par les MMPs. L'étude de ces protéases et de leurs inhibiteurs permettrait d'en savoir davantage sur les événements post mortem dans le muscle.

f) Les caspases

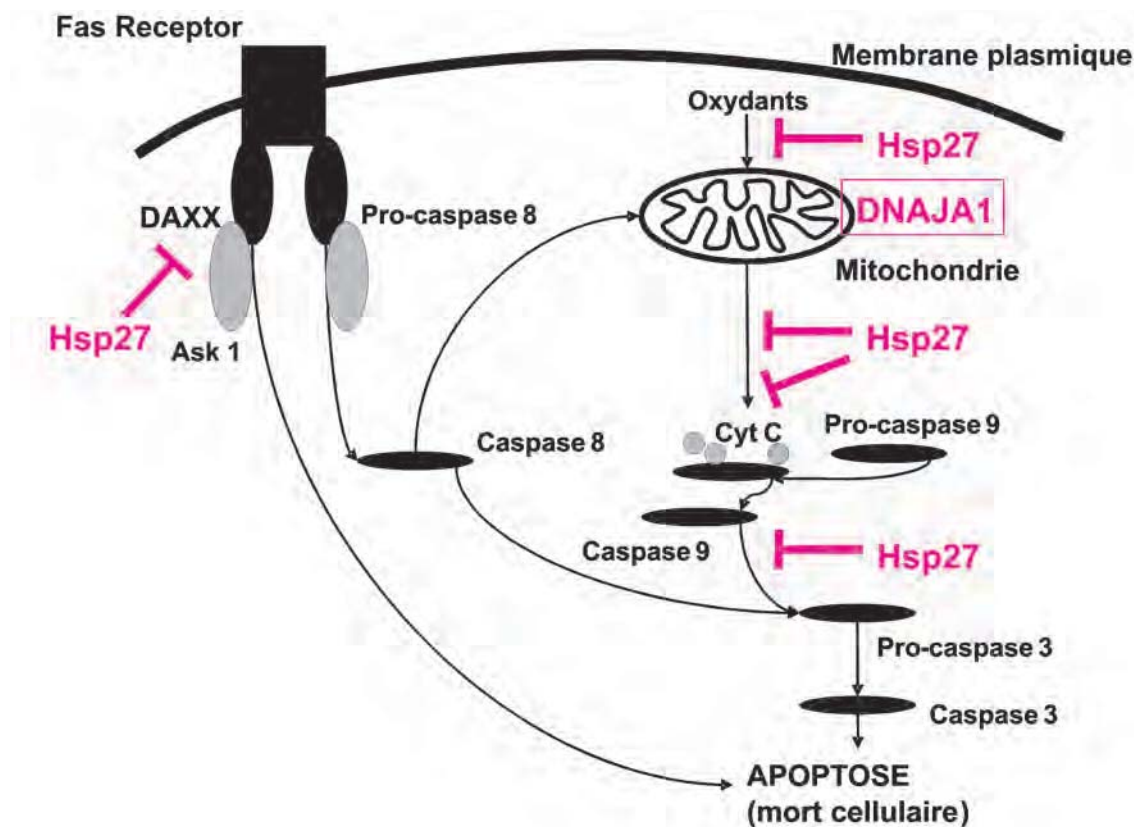
Les caspases sont des peptidases à cystéines capables de cliver des protéines après un résidu d'acide aspartique. Elles ont un rôle dans l'apoptose (initiation et accomplissement), et pourraient en avoir d'autres dans différents mécanismes cellulaires (notamment dans l'inflammation). Différentes formes ont été identifiées dans différents tissus et dans des organismes aussi variés que les nématodes et *Homo sapiens* (Ouali *et al* 2006). Une caspase est formée de trois domaines : un domaine N-terminal, dont le rôle est de réaliser les interactions protéine-protéine, un second domaine formant la grande sous-unité portant le site actif, et un troisième domaine qui a un rôle dans la conformation de la protéine. Pour être active, une caspase doit subir divers clivages protéolytiques. Leur rôle dans la tendreté *via* les phénomènes d'apoptose a été suggéré par Ouali *et al* (2006). En effet, la desmine et la vimentine, protéines de structure de la fibre musculaire, sont dégradées par les caspases (Nakanishi *et al* 2001, Chen *et al* 2003). Cette dégradation produit un signal d'inhibition de la synthèse du filament intermédiaire (structure de soutien et d'ancrage des myofibrilles dans la fibre musculaire).

2.4 / L'apoptose

Ainsi, plusieurs enzymes participant au phénomène d'apoptose semblent être impliquées dans la tendreté de la viande. L'apoptose est un mécanisme physiologique de mort cellulaire programmée (Taylor *et al* 2008) qui permet d'éliminer les cellules endommagées ou dangereuses pour les autres cellules. C'est un phénomène essentiel à la vie d'un organisme, notamment au cours de son développement. Ce processus comprenant deux voies d'initiation majeures est très conservé depuis les organismes monocellulaires jusqu'aux mammifères.

Dans la première voie (figure 2), le stimulus est externe à la cellule et correspond à l'activation d'un récepteur de mort cellulaire par un ligand activateur qui va initier l'activation des caspases (Concannon *et al* 2003).

Dans la deuxième, l'événement activateur est la rupture de la membrane mitochondriale. Cela permet le largage du cytochrome c dans le cytoplasme. Le cytochrome c forme avec d'autres protéines un complexe nommé l'apoptosome, qui va activer des caspases. Généralement, durant des phéno-

Figure 2. Principales protéines impliquées dans l'apoptose. Adapté de Concannon *et al* (2003).

mènes de stress, des protéines du choc thermique (*Heat Shock Protein* : HSP) sont synthétisées et ont un rôle anti-apoptotique, par formation d'un complexe avec les caspases pour les inhiber, par la protection des protéines cibles pour les prévenir de la dégradation, et enfin par le rétablissement des structures protéiques.

Lors de l'abattage, l'exsanguination de la carcasse prive les cellules de nutriments et d'oxygène. Les cellules s'engagent alors dans la voie de mort programmée. L'apoptose serait donc un processus précoce intervenant dans la mise en place de la tendreté (Ouali *et al* 2006). Selon ces auteurs, les premières protéases actives lors de l'abattage seraient les caspases dont la fonction première est de cliver les protéines cellulaires *in vivo*. Leurs substrats dans la cellule seraient nombreux (de l'ordre de centaines de protéines différentes dégradées), ce qui est comparable à ce qui a été rapporté pour les calpaïnes. Les caspases pourraient donc dégrader des protéines clés dans l'organisation structurale des myofibrilles (Nakanishi *et al* 2001, Chen *et al* 2003), conjointement avec d'autres protéases, et donc ainsi jouer un rôle de premier plan dans la mise en place précoce de la tendreté, avant les calpaïnes. Ainsi, selon la théorie de

Ouali *et al* (2006) il existerait une étape supplémentaire dans l'évolution de la tendreté, avant la phase de *rigor mortis*, durant laquelle l'apoptose a un rôle prépondérant (figure 1B). Cette implication de l'apoptose dans la tendreté est remise en cause par certaines études. Par exemple, Underwood *et al* (2008) montrent que, bien que la caspase 3 soit présente dans le muscle bovin durant la maturation, son activité n'est pas corrélée à la note de tendreté mécanique obtenue par Warner-Braztler. Selon les auteurs, la caspase 3 ne participerait donc pas de manière significative à la protéolyse post mortem.

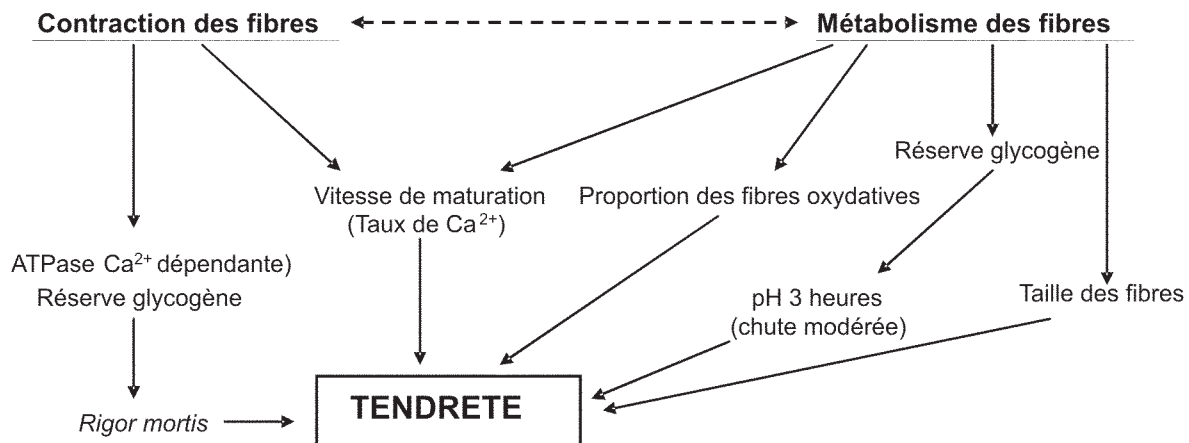
2.5 / Les fibres musculaires

Les fibres musculaires, qui occupent la majorité du volume du muscle, sont classées sur la base de leurs propriétés contractiles (vitesse de contraction lente ou rapide) et métaboliques (métabolisme glycolytique qui utilise principalement les glucides comme source d'énergie et métabolisme oxydatif utilisant non seulement le glucose mais aussi les acides gras). Ainsi, dans le muscle de bovin adulte on distingue trois types de fibres : SO (*slow oxydative*), FOG (*fast oxido-glycolytic*) et FG (*fast glycolytic*) (Picard *et al* 2003). Ces types sont présents en proportions

variables dans les différents muscles de la carcasse.

Les protéines myofibrillaires participent également au déterminisme de la tendreté de la viande bovine (figure 3). Les propriétés contractiles et métaboliques des fibres produisent toutefois des effets variables sur la tendreté. Ils varient en effet en fonction du muscle, des animaux et des races, ce qui constitue un défi à l'établissement d'une définition claire et consensuelle de la contribution des fibres à la tendreté. Néanmoins, plusieurs points ont pu être dégagés à l'heure actuelle, même si certains d'entre eux sont sujets à débats et discussions (Renand *et al* 2001).

La vitesse de maturation, processus essentiel dans l'établissement de la tendreté, est influencée par le métabolisme glycolytique ou oxydatif des fibres et par leur type contractile. En effet, l'étude de Ouali et Talmant (1990) montre que le rapport calpaïne/calpastatine est plus élevé dans les muscles à contraction rapide. Ainsi, la protéolyse est plus importante et donc la vitesse de maturation est plus grande. C'est ce qui explique la différence de temps de maturation très courte pour les viandes blanches comparativement à la viande rouge.

Figure 3. Caractéristiques des fibres influençant la tendreté.

L'étude de Dransfield *et al* (2003) rapporte que la valeur du pH à 3 h post mortem explique 52% de la variation de la tendreté entre animaux pour les deux muscles *Semitendinosus* et *Longissimus thoracis* (Dransfield *et al* 2002, 2003). En effet, le pH doit connaître une baisse modérée, pas trop rapide, pour que la tendreté soit jugée bonne. En conséquence, le potentiel glycolytique des fibres constitue un critère important dans l'évolution du pH à 3 h post mortem. Les muscles les plus glycolytiques présentent une chute de pH trop rapide et sont donc défavorables à la tendreté sur ce critère par rapport aux muscles plus oxydatifs (Maltin *et al* 2003). Par exemple, le muscle *Longissimus thoracis*, oxydatif et plus tendre, est caractérisé par une valeur de pH plus élevée (6,4) à 3 h post mortem alors que le *Semitendinosus*, glycolytique et plus dur, présente une valeur de pH plus faible (6,0).

La taille des fibres a également un impact sur la tendreté de la viande. Plusieurs études ont mis en évidence des relations négatives, de -0,11 à -0,53 (Crouse *et al* 1991, Renand *et al* 1997). Les animaux dont les muscles sont constitués de fibres plus fines donnent des viandes plus tendres. D'après Crouse *et al* (1991), la taille des fibres serait un facteur déterminant pour la tendreté précoce avant 14 jours de maturation.

Ainsi, sur le critère de la taille, les fibres oxydatives, plus petites, sont donc plus favorables à la tendreté que les fibres glycolytiques. Le diamètre des fibres oxydatives est limité afin de permettre une diffusion plus efficace de l'oxygène que dans une fibre de grande taille (Maltin *et al* 2003). Cependant, pour certaines études dont celle de Dransfield *et al* (2003), le facteur

«taille des fibres» est peu important en comparaison des facteurs «pH» et «type métabolique».

Le type métabolique des fibres musculaires influe également sur la tendreté. Mais la nature de la relation entre type métabolique et tendreté est complexe. Ainsi, les études de Zamora *et al* (1996) montrent que la résistance mécanique des muscles est corrélée positivement ($r = +0,65$) à l'activité de l'enzyme oxydative citrate synthase. Donc, plus un muscle est rouge, plus sa dureté est importante après maturation. Les études réalisées par Renand *et al* (1997, 2001) montrent également une variabilité inter animale, les animaux avec des muscles de type oxydatif ayant une viande plus dure.

Cependant, contrairement à ces résultats, Maltin *et al* (1998) montrent une corrélation positive ($r = 0,48$) entre la tendreté et la proportion de fibres SO, et une corrélation négative ($r = -0,38$) entre la tendreté et la proportion de fibres FG. Ces auteurs mettent en avant l'importance du turnover protéique dans les fibres à métabolisme oxydatif pour expliquer une plus forte dégradation des protéines myofibrillaires, et donc une tendreté plus prononcée. L'étude de Strydom *et al* (2000) montre une corrélation positive entre la fragmentation myofibrillaire et les fibres rouges SO ($r = 0,48$) d'une part, et les fibres intermédiaires FOG ($r = 0,83$) d'autre part, et de la même manière, une corrélation négative entre la fragmentation myofibrillaire et les fibres blanches FG ($r = -0,72$). Ces résultats sur la dégradation myofibrillaire plus élevée dans les fibres oxydatives sont en contradiction avec les travaux de Ouali et Talmant (1990) montrant par comparaison de différents types de muscles, que le taux de matu-

ration est plus important dans les fibres glycolytiques que dans les fibres oxydatives. L'étude de Dransfield *et al* (2003) montre également que les viandes tendres possèdent une proportion supérieure de fibres SO et inférieure de fibres FOG.

Toutefois, les différents résultats doivent être pondérés par les différences entre les systèmes de production étudiés. Ainsi, les études menées par Maltin *et al* (2003) et Strydom *et al* (2000) portent sur des races anglaises et croisées pour le premier, et sud-africaines pour le deuxième. Les études de Zamora *et al* (1996) et Renand *et al* (1997) portent sur des taurillons Charolais. Quant à l'étude de Dransfield *et al* (2003), elle a porté sur 4 races : Aubrac, Charolaise, Limousine, Salers, et sur des taurillons et des vaches d'âges différents. Ainsi, les relations entre métabolisme des fibres et tendreté évoluent différemment selon les systèmes de production. De plus, l'impact du type métabolique des fibres sur la tendreté peut changer du tout au tout en fonction du muscle. Ainsi, Maltin *et al* (2003) montrent que plus le muscle *Longissimus lumborum* est oxydatif, plus il est tendre, à l'inverse du muscle *Vastus lateralis*. L'étude de Picard *et al* (2006) montre le même type de résultats sur les muscles *Longissimus thoracis* (LT oxydatif) et *Semitendinosus* (ST glycolytique). Elle montre en particulier que les relations entre la tendreté et les caractéristiques biochimiques sont plus marquées chez les vaches que chez les taurillons en croissance. Le muscle LT des vaches apparaît le plus tendre lorsqu'il contient le plus de lipides totaux et de triglycérides, qu'il présente les propriétés les plus lentes et oxydatives, et renferme les teneurs en collagène total et insoluble les plus faibles (Picard *et al*

2007). De manière opposée, les muscles ST les plus tendres sont ceux qui ont les activités glycolytiques (Lactate deshydrogenase, LDH) les plus élevées. Il n'y a d'ailleurs que cette propriété qui apparaît être significativement corrélée à la tendreté dans ce muscle. Ceci démontre que selon le type de muscle considéré, la tendreté de la viande peut être expliquée par des caractéristiques différentes. Ceci permet de comprendre les nombreuses contradictions rencontrées dans la bibliographie sur les relations entre caractéristiques biochimiques et qualité sensorielle de la viande. En effet, selon les auteurs, les études ont été conduites sur des types de muscles ou d'animaux différents. Ceci montre également qu'aucune caractéristique d'un muscle donné ne peut être prédicteur de la qualité sensorielle de l'ensemble des autres muscles de la carcasse.

La relation entre type métabolique et tendreté est donc très complexe, car sans doute contrôlée par un grand nombre de facteurs dont beaucoup sont encore inconnus. D'autre part, cette relation dépend de la source de variabilité étudiée et donc du jeu de données analysé. Ainsi, par exemple, les conclusions issues de comparaisons entre muscles ne sont généralement pas extrapolables aux comparaisons entre races ou conditions de production pour un muscle donné.

3 / Identification de nouveaux marqueurs biologiques

Les processus physiologiques et notamment les propriétés du muscle déterminantes pour la qualité de la viande dépendent de nombreux gènes agissant de concert et beaucoup plus rarement de quelques gènes aux effets majeurs. Au cours des dernières décennies, les techniques en « omique » ont rendu possible l'étude simultanée de milliers de gènes ou protéines grâce à des techniques à haut débit. Ainsi, les scientifiques recherchent des gènes ou des réseaux de gènes agissant en interaction pour contrôler la biologie du muscle et par voie de conséquence la qualité de la viande qui en résulte. Une des forces des approches en « omique » est d'identifier des gènes ou des protéines dont les mutations naturelles, les niveaux d'expression ou les teneurs diffèrent entre des animaux produisant des viandes tendres ou dures, sans hypothèse sur les mécanismes mis en

jeu générant ainsi de nouvelles pistes de recherche (Hocquette *et al* 2007b). Les résultats attendus sont l'identification de gènes ou de marqueurs susceptibles d'aider à la sélection génétique (Bidanel *et al* 2008) ou à la détection d'animaux ayant des caractéristiques désirées (Hocquette *et al* 2007b, Cassar-Malek *et al* 2008).

Les approches de génomique ont nécessité un investissement méthodologique important en transcriptomique pour la préparation d'outils adaptés à l'étude du tissu musculaire (Lehnert *et al* 2004, Sudre *et al* 2005), en protéomique pour identifier les protéines du muscle (Bouley *et al* 2004, Chaze *et al* 2006) et enfin en analyse de données (Meunier *et al* 2005, 2007, Kadanga *et al* 2007).

L'utilisation de la génomique fonctionnelle permettant une recherche sans *a priori* de marqueurs biologiques de la tendreté sur des centaines, voire des milliers de gènes ou de protéines, permet d'établir une liste de candidats potentiels de marqueurs de la tendreté.

3.1 / Les apports de la transcriptomique

Des analyses de transcriptomique (analyse de l'expression des gènes par étude des ARN messagers) ont permis de mettre en évidence des gènes dont le profil d'expression est relié à la tendreté. En particulier dans l'étude de Bernard *et al* (2007) réalisée en France les analyses différentielles des transcriptomes de muscles LT de taurillons charolais ont révélé 112 gènes associés à la tendreté déterminée par un jury d'analyse sensorielle (tableau 1). Parmi ces résultats, notons l'expression du gène DNAJA1 qui est inversement cor-

relée à la tendreté de la viande (Bernard *et al* 2007). L'association de l'expression du gène DNAJA1 avec la tendreté a fait l'objet d'un dépôt de brevet. Ce gène code pour une protéine chaperonne de la famille des HSP : Hsp40. Cette protéine intervient dans l'entrée des protéines dans la mitochondrie et inhibe le mécanisme d'apoptose en interaction avec une autre protéine chaperonne : Hsp70. Cette activité anti-apoptotique pourrait ralentir le processus de mort cellulaire durant les premières phases de la maturation en accord avec la théorie proposée par Ouali *et al* (2006). La relation entre l'expression de DNAJA1 et la tendreté mise en évidence sur des taurillons a été validée sur le muscles LT de bœufs de race Charolaise (Bernard *et al* 2007).

Le gène CRYAB est également sous-exprimé dans les lots de tendreté supérieure. Ce gène code pour l' α B-crystalline B (famille des HSP) qui joue un rôle important dans la protection des filaments en prévenant leur agrégation (Capetanaki *et al* 2007). La sous-expression de cette protéine accélérerait la dégradation des filaments et par voie de conséquence, augmenterait la tendreté.

Par ailleurs, l'analyse du transcriptome en fonction de la force de cisaillement de la viande a permis de mettre en évidence des gènes plus exprimés dans les viandes dures parmi lesquels plusieurs HSP dont DNAJA1, DNAJB11 et HSPB1. DNAJA1 et DNAJB11 sont 1,2 à 1,3 plus exprimés dans les viandes avec une force de cisaillement élevée, surtout chez de jeunes taurillons âgés de 15 mois. Le gène HSPB1 (codant pour la Hsp27) est 2 fois plus exprimé à 15 mois dans les viandes dures. Ces différences expliquent chacune de 18 à

Tableau 1. Quelques gènes dont le niveau d'expression est relié à la tendreté (adapté de Bernard *et al* (2007)).

Gène	Nom	Effet sur la tendreté
<i>Cbr2</i>	Carbonyle réductase 2	Positif
<i>CPT1B</i>	Carnitine Palmitoyltransférase 1B	Positif
<i>Cyp2c50</i>	Cytochrome P450 polypeptide 50	Positif
<i>LAMA3</i>	Laminine α 3	Positif
<i>NDUFB4</i>	NADH déshydrogénase sous-complexe β	Positif
<i>CCR5</i>	Chemokine récepteur 5	Positif
<i>MYH7</i>	Myosine, polypeptide lourd 7 (muscle cardiaque)	Positif
<i>Tpm3</i>	Tropomyosine 3	Positif
<i>CRYAB</i>	Crystalline α B	Négatif
<i>DNAJA1</i>	Hsp40	Négatif
<i>HSPB1</i>	Hsp27	Négatif
<i>PDK4</i>	Pyruvate déshydrogénase kinase, isoforme 4	Négatif

20% de la variabilité de la dureté de la viande sur un effectif de 25 taurillons (Hocquette *et al* 2007a). La Hsp27 est une protéine du choc thermique impliquée dans la résistance au stress et l'organisation de l'actine. La sous-expression de cette protéine serait la cause d'une désorganisation des filaments d'actine menant à leur dégradation. D'autres études ont montré que cette protéine Hsp27 peut interagir avec les protéines de la voie de l'apoptose, notamment dans l'activation des caspases (Herrera-Mendez *et al* 2006).

D'une façon générale, l'expression des HSP de petite taille est stimulée après l'abattage suite au processus de mort cellulaire. L'évolution post mortem de l'expression de ces HSP semble dépendre de la protéine considérée, du génotype mais surtout de l'évolution du pH post mortem. La distribution des HSP de petite taille entre les fractions solubles et insolubles de protéines musculaires est également fortement dépendante du pH (Pulford *et al* 2008). Il est donc probable que ces protéines ne soient reliées à la tendreté de la viande que dans des conditions spécifiques d'abattage des animaux, c'est-à-dire dans des conditions comparables de pH et d'évolution post mortem de la viande.

D'autres études faisant appel à la technologie du transcriptome ont été conduites en Corée. Ces travaux indiquent que la force de cisaillement (donc la dureté) de la viande semble corrélée positivement au métabolisme oxydatif du muscle et négativement aux gènes impliqués dans la signalisation cellulaire (Kee *et al* 2008).

De nombreux travaux de transcriptomique ont également été réalisés en Australie pour identifier des gènes dont le niveau d'expression est associé à la teneur en lipides intramusculaires (voir par exemple Wang *et al* 2005). Ces travaux sont également importants pour la maîtrise de la tendreté dans la mesure où une teneur élevée en lipides intramusculaires est un facteur favorable pour la tendreté de la viande dans les conditions de production et de consommation de la viande bovine dans ce pays.

D'autres travaux de transcriptomique ont également été conduits chez des bovins à fort potentiel de croissance (Sudre *et al* 2005, Bernard *et al* 2009) afin de préciser les conséquences sur la qualité de la viande d'une sélection sur le potentiel de croissance musculaire.

En accord avec des études cellulaires précédentes, des analyses transcriptomiques réalisées sur les muscles *Rectus abdominis* (oxydatif) et *Semitendinosus* (glycolytique) de jeunes taureaux de race Charolaise montrent que la sélection sur la vitesse de croissance diminue l'activité oxydative des muscles. De même, certains gènes impliqués dans la structure musculaire ou la régulation cellulaire sont plus exprimés chez les taurillons à faible potentiel de croissance (Sudre *et al* 2005). Plus récemment, une surexpression de 2/3 des gènes de la glycolyse a été mise en évidence dans le muscle *Longissimus thoracis* chez les taurillons à fort potentiel de croissance musculaire. De plus, le niveau d'expression de gènes (*FGF6*, *PLD2*) connus pour leur implication dans les phénomènes d'hypertrophie musculaire chez les rongeurs a été corrélé à l'augmentation de la masse musculaire des taurillons indépendamment de leur masse adipeuse (Bernard *et al* 2009).

3.2 / Les apports de la protéomique

Il est intéressant de noter que les niveaux d'abondance des protéines Hsp27 et α B-crystalline ont été trouvés corrélés à la tendreté dans plusieurs études indépendantes de protéomique (Bouley 2004a, Herrera-Mendez *et al* 2006, Morzel *et al* 2008). Chez l'animal vivant, l'importante quantité de Hsp27 protège l'actine de la dégradation. Toutefois, après l'abattage la protéolyse de l'actine augmente. En effet, Hsp27 empêche l'aggrégation protéique et favorise ainsi l'accès des protéases à leurs cibles. La protéolyse durant la maturation est donc facilitée ce qui a pour conséquence une augmentation de la tendreté. La protéine Hsp27 est une bonne candidate pour constituer un marqueur pertinent de la tendreté, une haute concentration de cette protéine chez l'animal vivant étant liée à une meilleure tendreté après maturation. Le rôle de l' α B-crystalline est similaire à celui de la Hsp27. Les données de Morzel *et al* (2008) montrent que la quantité de protéines dégradées au cours de la maturation augmente pour l'actine, la créatine kinase, l' α B-crystalline et la Hsp27. Ces dernières seraient des substrats de la protéolyse post mortem. D'autre part, cette étude réalisée sur le LT de taurillons de race Blonde d'Aquitaine a montré que la quantité de succinate deshydrogénase (SDH, enzyme mitochondriale du métabolisme oxydatif) est corrélée positivement à la tendreté ($r = + 0,81$). Cette enzyme du cycle

de Krebs pourrait être un marqueur biologique de la tendreté. Ceci est en accord avec les résultats d'une étude protéomique conduite sur des taurillons de race Charolaise, montrant que les muscles LT les plus tendres sont de type plus lent oxydatif que les muscles LT les moins tendres (Hocquette *et al* 2007a).

Une autre étude effectuée par Bouley *et al* (2004b) sur les protéines du muscle *Semitendinosus* de taurillons de trois races : Charolaise, Limousine et Salers, classés en fonction de la tendreté de leur viande, élevée (T+) ou faible (T-), montre des différences dans les marqueurs révélés selon la race (tableau 2). En effet, au sein de la race Charolaise, 10 protéines sont différenciellement exprimées entre les deux lots de tendreté, 5 protéines au sein de la race Limousine, et 5 protéines au sein de la race Salers. Ainsi, chez les Charolais, 6 protéines sont associées à l'appareil contractile : *Myosin Binding protein-H* (MyBP-H), les Troponine T rapides (fTnT), et lente (sTnT), les isoformes de chaînes légères de myosine (MLC1sa, MLC2-P et MLC2). Pour la race Limousine, deux protéines sont associées à l'appareil contractile : MyBP-H et MLC2, une autre est associée au cycle du calcium la parvalbumine (PV), et une quatrième l'*Acetyl Binding Protein* (ACBP) est impliquée dans le métabolisme de l'acétyl-coA et aurait un rôle dans le cycle du calcium. Pour la race Salers, deux protéines appartiennent au métabolisme glycolytique : la phosphoglucotransférase (PGM) et l'isoforme B de la lactate deshydrogénase (LDH-B). Aucune protéine différenciellement exprimée n'est commune aux trois races. Grâce à ces observations, il apparaît que le déterminisme de la tendreté est différent selon la race des animaux. Néanmoins, les races à viande (Charolaise et Limousine) semblent se distinguer de la race Salers qui est une race rustique, les viandes de cette dernière étant plus oxydatives et métabolisant moins le glycogène.

Une compilation des résultats de Bouley *et al* (2004b, 2005) permet de mettre en évidence des protéines corrélées à la fois à la tendreté et à l'hypertrophie musculaire (tableau 3). Parmi elles, les isoformes de Troponine T rapides (fTnT), la MyBP-H, et PGM sont des marqueurs potentiels intéressants car une modification de leur expression, par le biais de changements des conduites d'élevage, peut augmenter la masse musculaire de l'animal tout en garantissant une amélioration de la tendreté de sa viande.

Tableau 2. Protéines identifiées dans l'étude de la tendreté de la viande chez trois races bovines, dans le lot T+ (Adapté de Bouley *et al*, 2004b).

Protéines communes aux trois races	Charolais	Limousin	Salers
Phosphoglucumutase (PGM)	-		-
Myosin-binding protein (MyBP-H)	+	+	
Myosin regulatory light chain 2 skeletal muscle isoform (MLC2)	-	-	
Parvalbumin (PV)	+	+	
Non identifiée (pHi 5,7/8kDa)	+	+	

Protéines communes d'une race			
Fast troponin T (fTnT) exon 17	+		
Slow troponin T (sTnT)	+		
Myosin light chain 1 A isoform (MLC1sa)	+		
Myosin regulatory light chain 2 skeletal muscle isoform (MLC2-P)	+		
Heat shock protein 27 (Hsp27)	-		
Acyl-coA binding protein (ACBP)		+	
Lactate dehydrogenase B chain (LDH-B)			-
Sarcoplasmic reticulum 53kDa glycoprotien (SR53G)			-
P20			-
Non identifié (pHi 6,5/65kDa)			+

Le niveau d'abondance des protéines, du lot de tendreté supérieur T+ par rapport au lot de tendreté inférieure T-, est indiqué par des + ou -.

D'autres analyses protéomiques portant sur le muscle bovin LT ont été effectuées par Sawdy *et al* (2004) 36 h post mortem, et ont permis la visualisation de 7 bandes sur gel d'électrophorèse bidimensionnelle 2DE qui sont corrélées positivement avec la tendreté à 7 jours après abattage. Parmi celles-ci, deux ont été identifiées comme étant des fragments de chaîne lourde de myosine. Ces résultats montrent que la dégradation des protéines myofibrillaires, en particulier la chaîne lourde de myosine, est importante pour la tendreté. De plus, l'analyse de la dégradation de ces protéines 36 h après l'abattage serait un bon outil de prédiction de la

tendreté à 7 jours, voire de classification des carcasses en fonction de leur catégorie de tendreté.

Enfin, une comparaison de profils protéomiques a été effectuée sur deux muscles bovins, le *Longissimus dorsi* (LD, le plus tendre), et le *Semitendinosus* (ST, le plus dur) par Jia *et al* (2006). Les auteurs ont réalisé la comparaison des profils protéiques de ces deux muscles au moment de l'abattage (T = 0) et 24 h après (T = 24). Il en ressort que 13 spots protéiques sont différenciellement présents entre les deux temps dans le muscle LT et 18 pour le ST (tableau 4). Au sein des deux

muscles, il y a une diminution de cofiline, du substrat de la protéine mitochondriale ATP-dépendante SP-22, des Hsp27 et Hsp20. La cofiline, connue pour contrôler la polymérisation de l'actine, chute de manière plus drastique dans le ST. Plusieurs isoformes de Hsp27 sont observées. La quantité de l'une de ces isoformes montre une baisse importante dans le muscle LT. Les Hsp27 et Hsp20 sont des protéines chaperonnes impliquées dans l'organisation et la protection des structures myofibrillaires, et localisées au niveau des structures sarcomériques telles que les bandes Z et I. L'expression de l'enzyme métabolique lactoylglutathione lyase, intervenant dans la voie de production de l'acide lactique, augmente en particulier dans le ST. Cette enzyme reflète la transition vers le métabolisme anaérobie après l'abattage (Jia *et al* 2006).

Les différences protéiques observées entre les deux muscles seraient à mettre en relation avec les différences de tendreté entre le LT et ST. L'abondance de l'enzyme glycolytique triosephosphate isomérase chute dans le LT. La quantité de cette enzyme est corrélée à la tendreté dans la viande porcine (Lametsch *et al* 2003). Dans le ST, des changements sont constatés pour les protéines structurales que sont l'actine alpha 1 et la chaîne alpha de tubuline, dont l'abondance diminue. Dans ce même muscle, la quantité de sous-unités du protéasome baisse également. Le protéasome est ATP-dépendant et la disparition de la molécule énergétique pourrait être à l'origine de cette baisse. Le rôle du protéasome dans la maturation post mortem est encore peu clair, mais il pourrait contribuer à la maturation et ainsi être un facteur favorable à la tendreté. D'autres protéines comme

Tableau 3. Protéines impliquées dans des viandes de tendreté supérieure (cas du muscle *Semitendinosus*) et intervenant dans l'hypertrophie musculaire (réalisé à partir des résultats de Bouley *et al* (2004b, 2005).

Protéine		Corrélation hypertrophie/tendreté
p20 014558, spot 122	p20	Négative/Négative (S)
Slow troponin T (low Mr)	sTnT	Négative/Positive (C)
Fast troponin T exon 17	fTnT	Négative/Positive (C)
Myosin light chain 1, isoform A	MLC1a	Négative/Positive (C)
Sarcoplasmic reticulum 53kDa glycoprotein	SR53G	Positive (culard uniquement)/Négative (S)
Phosphoglucumutase	PGM	Positive (culard uniquement)/Négative (S, C)
Myosin regulatory lightchain 2, skeletal muscle isoform (phosphorylated, spot 135)	MLC2-P	Positive/Positive (C)
Parvalbumin	PV	Positive/Positive (C, L)
Myosin-binding protein H	MyBP-H	Positive/Positive (C, L)

Les protéines de l'hypertrophie musculaire concernent les animaux culards et normaux à forte croissance musculaire. Les protéines de viande de tendreté supérieure ont été trouvées dans les races Charolaise (C), Limousine (L) et Salers (S) sans être forcément communes aux trois races. Les protéines les plus intéressantes, c'est-à-dire celles qui sont corrélées dans le même sens à la fois pour la tendreté et l'hypertrophie musculaire, sont en gras.

Tableau 4. Protéines différenciellement exprimées dans les muscles LT et ST entre les temps $T = 0$ et $T = 24$ (adapté de Jia et al, 2006).**Longissimus dorsi**

Protéine	Ratio d'expression
Myosin light chain 1 fragment	11,2
Cofilin	- 7,2
Triosephosphate isomerase	- 6,7
Lactoylglutathione lyase	3,4
Inconnu	- 9,1
Inconnu	- 9,6
Myosin regulatory light chain 2	- 3,1
Heat shock 27 kDa protein (isoform pHi = 6,3 – Mr = 25,0)	- 3,3
Heat shock 27 kDa protein (isoform pHi = 6,2 – Mr = 25,5)	- 4,7
Heat shock 27 kDa protein (isoform pHi = 5,9 – Mr = 25,5)	- 13,4
Substrate protein of mitochondrial ATP-dependent proteinase SP-22	- 0,7
Beta-actin (fragment)	- 12,1
Heat shock protein beta-2 HSP20 (pHi = 5,2 – Mr = 20,0)	- 5,7

Semitendinosus

Protéine	Ratio d'expression
Cofilin	- 17,4
T-complex-type molecular chaperone TCP1	- 2,8
Proteasome subunit alpha type 3	- 2,6
Proteasome subunit beta type 3	- 3,5
Lactoylglutathione lyase	40,6
Substrate protein of mitochondrial ATP-dependent proteinase SP-22	- 2,2
Proteasome subunit beta type 7	- 2,4
Inconnu	- 1,6
Heat shock 27 kDa protein (isoform pHi = 6,1 – Mr = 26,0)	- 10,3
Heat shock 27 kDa protein (isoform pHi = 6,4 – Mr = 26,0)	- 6,2
Proteasome beta-subunit	- 2,3
Actin alpha 1 skeletal muscle protein	- 3,2
14-3-3 protein	- 3,7
Tubulin alpha chain	- 4,9
26S protease regulatory subunit 6A (TAT-binding protein 1)	- 5,2
Mitogen-activated protein kinase 14	- 1,6
Proteasome 26S subunit MSS1	- 2,3
Heat shock protein beta-6 HSP20 (pHi = 6,5 – Mr = 19,0)	- 5,9

Les ratios d'expression entre les deux temps pour un muscle correspondent à des pourcentages de volume de spot sur les gels 2DE, après analyse digitale des images. Les protéines communes aux deux muscles sont en gras.

la TCP1 (protéine chaperonne ATPasique de l'actine et la tubuline), la protéine 14-3-3 (protéine régulatrice de fonctions cellulaires se fixant sur d'autres protéines) et la kinase 14 (protéine phosphorylant des facteurs de transcription et activée par des stress environnementaux) subissent également une diminution de leur expression, due à la disparition de l'ATP. Leur contribution à la tendreté est pour le moment inconnue.

L'étude de Lametsch *et al* (2003) souligne la disparité qu'il existe au sein d'un même animal entre deux muscles

différents (le LT et le ST) au niveau physiologique, métabolique et protéique. Il en découle une tendreté différente, résultant à la fois de facteurs distincts et communs entre les muscles, qui met en lumière le rôle de certaines protéines.

Ainsi, les programmes d'analyses transcriptomiques et protéomiques, mis en place depuis plusieurs années, ont permis l'analyse de nombreux profils de muscles bovins et de relier le phénotype tendreté (données physiologiques et biochimiques) avec l'expression des gènes (données transcriptomiques et

protéomiques). Cette approche intégrative a permis de constituer une liste de marqueurs biologiques de la tendreté. Après validation du rôle de ces marqueurs dans la tendreté dans différents systèmes de production, la quantité de ces derniers pourrait être contrôlée dans le muscle bovin par des facteurs d'élevage et permettre ainsi une meilleure maîtrise de la tendreté de la viande bovine du vivant de l'animal.

Conclusion

La tendreté de la viande bovine a fait l'objet de nombreux travaux depuis plusieurs décennies. La variabilité des résultats selon les expérimentations atteste du caractère complexe et multifactoriel de ce critère de qualité sensorielle. Les divergences observées entre muscles et types d'animaux démontrent que la maîtrise de la tendreté doit être basée sur l'utilisation d'un ensemble de marqueurs et non pas sur un seul. C'est pourquoi des études complémentaires sont en cours pour valider les marqueurs détectés sur un type de muscle ou d'animal sur un ensemble plus large de muscles de différentes propriétés et sur plusieurs types d'animaux (taurillons, bœufs, vaches, génisses) de différentes races et conduits selon différents systèmes de production. Ces études aboutiront à la constitution d'outils : puces à ADN (projet GENOTEND en cours) ou à protéines pouvant être utilisées en routine pour définir et contrôler le potentiel d'un animal à produire une viande tendre. De plus, la connaissance de l'influence des facteurs de production sur l'expression des marqueurs biologiques de la tendreté, permettra de proposer des outils d'aide à la décision pour choisir le type de conduite d'élevage le plus approprié à l'expression de ces gènes. Ainsi, cela garantira la production d'une viande de bonne tendreté pour le consommateur. Cette approche phénotypique est complémentaire des analyses génétiques de recherche de Quantitative Trait Locus (QTL) «tendreté de la viande». Elle pourra à terme fournir des données phénotypiques utilisables dans des programmes de sélection génomique pour la tendreté de la viande.

Références

- Balcerzak D., Querengesser L., Dixon W. T., Baracos V. E., 2001. Coordinate expression of matrix-degrading proteinases and their activators and inhibitors in bovine skeletal muscle. *J. Anim. Sci.*, 79, 94-107.
- Bauchart D., Ortigues-Marty I., Hocquette J. F., Gruffat D., Durand D., 1996. Energy and fat metabolism of the liver, the digestive tract and muscles: transport, processing, energy consumption, fixation by tissues. In: *Veal, Perspectives to the year 2000*, Le Mans, France, 255-290.
- Bendall J. R., 1973. The biochemistry of rigor mortis and cold-contraction. *Proc. Eur. Meet. Meat Research Workers*, 19 (Part I), 1-27.
- Bernard C., Cassar-Malek I., LeCunff M., Dubroeuq H., Renand G., Hocquette J. F., 2007. New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 5229-5237.
- Bernard C., Cassar-Malek I., Renand G., Hocquette J.F., 2009. Changes in muscle gene expression related to metabolism according to growth potential in young bulls. *Meat Sci.*, 82, 205-212.
- Bidanel J.P., Boichard D., Chevalet C., 2008. From genetics to genomics. *INRA Prod. Anim.*, 21, 15-31.
- Bouley J., 2004a. Analyse protéomique du muscle de bovin appliquée à la recherche de marqueurs de la tendreté de la viande. *Renc. Rech. Rum.*, 87-89.
- Bouley J., 2004b. Analyse protéomique du muscle squelettique bovin. Thèse, Dr. d'Université, option Biochimie, Université de Clermont-Ferrand 2, 157p.
- Bouley J., Chambon C., Picard B., 2004. Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, 4, 1811-1824.
- Bouley J., Meunier B., Chambon C., De Smet S., Hocquette J.F., Picard B., 2005. Proteomic analysis of bovine skeletal muscle hypertrophy. *Proteomics*, 5, 490-500.
- Capetanaki Y., Bloch R.J., Kouloumenta A., Mavroidis M., Psarras S., 2007. Muscle intermediate filaments and their links to membranes and membranous organelles. *Exp. Cell Res.*, 313, 2063-2076.
- Cassar-Malek I., Picard B., Bernard C., Hocquette J.F., 2008. Application of gene expression studies in livestock production systems: a European perspective. *Austr. J. Exp. Agric.*, 48, 701-710.
- Chambaz A., Scheeder M.R.L., Kreuzer M., Dufey P.A., 2003. Meat quality of Angus, Simmental, Charolais and Limousin steers compared at the same intramuscular fat content. *Meat Sci.*, 63, 491-500.
- Chaze T., Bouley J., Chambon C., Barboiron C., Picard B., 2006. Mapping of alkaline proteins in bovine skeletal muscle. *Proteomics*, 6, 2571-2575.
- Chen F., Chang R., Trivedi M., Capetanaki Y., Cryns V.L., 2003. Caspase proteolysis of desmin produces a dominant-negative inhibitor of intermediate filaments and promotes apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 278, 6848-6853.
- Chevalet C., Hocquette J.F., Sellier P., Monget P., 2007. AGENAE - GENANIMAL: the French research program in animal genomics. *Energy and Protein Metabolism and Nutrition*, 124, 311-312.
- Concannon C.G., Gorman A.M., Samalli A., 2003. On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. *Apoptosis*, 8, 61-70.
- Craplet C., 1966. La viande de bovins. Traité d'élevage moderne - De l'étable de l'éleveur à l'assiette du consommateur - Livre I. Vigot Frères Editeurs, France, 486p.
- Crouse J.D., Koohmaraie M., Seideman S.D., 1991. The relationship of muscle fibre size to tenderness of beef. *Meat Sci.*, 30, 295-302.
- Dargelos E., Poussard S., Brule C., Daurly L., Cottin P., 2008. Calcium-dependent proteolytic system and muscle dysfunctions: A possible role of calpains in sarcopenia. *Biochimie*, 90, 359-368.
- Depeyrot J.N., Djaout F., Ennifar M., Guillot C., Lacour L., Peslerbe M., Samson C., Scarsi F., Tardy V., Tregaro Y., Vallin B., Zegers J.P., 2008. Le marché des produits laitiers, carnés et avicoles en 2008. Office de l'élevage, Montreuil-sous-Bois, France, 119-196.
- Dransfield E., Abouelkaram S., Bauchart D., Culioli J., Jurie C., Lepetit J., Lestrat A., Martin J.F., Picard B., 2002. Qualité sensorielle de la viande provenant de 3 muscles de taurillons et de vaches de réforme des 4 races allaitantes du Massif Central. *Renc. Rech. Rum.*, 255-258.
- Dransfield E., Martin J.F., Bauchart D., Abouelkaram S., Lepetit J., Culioli J., Jurie C., Picard B., 2003. Meat quality and composition of three muscles from French cull cows and young bulls. *Anim. Sci.*, 76, 387-399.
- Dutaud D., Aubry L., Sentandreu M.A., Ouali A., 2006. Bovine muscle 20S proteasome: I. Simple purification procedure and enzymatic characterization in relation with postmortem conditions. *Meat Sci.*, 74, 327-336.
- Geay Y., Renand G., 1994. Importance de la variabilité génétique et du mode d'élevage des bovins sur les caractéristiques musculaires et les qualités organoleptiques de leurs viandes. *Renc. Rech. Rum.*, 177-182.
- Geay Y., Bauchart D., Hocquette J.F., Culioli J., 2001. Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. *Reprod. Nutr. Dev.*, 41, 1-26.
- Goll D.E., Thompson V.F., Li H.Q., Wei W., Cong J.Y., 2003. The calpain system. *Physiol. Rev.*, 83, 731-801.
- Got F., Culioli J., Berge P., Vignon X., Astruc T., Quideau J.M., Lethiecq M., 1999. Effects of high-intensity high-frequency ultrasound on ageing rate, ultrastructure and some physico-chemical properties of beef. *Meat Sci.*, 51, 35-42.
- Herrera-Mendez C.H., Becila S., Boudjellal A., Ouali A., 2006. Meat ageing: Reconsideration of the current concept. *Trends Food Sci. Technol.*, 17, 394-405.
- Hocquette J.F., Cassar-Malek I., Lestrat A., Jurie C., Jailler R., Picard B., 2005. Evolution des recherches sur le muscle des bovins et la qualité sensorielle de leur viande. II. Influence des facteurs d'élevage sur les caractéristiques musculaires. *Cahiers Agric.*, 14, 365-372.
- Hocquette J.F., Bernard C., Cassar-Malek I., Lepetit J., Micol D., Jurie C., Meunier B., Renand G., Picard B., 2007a. Mise en évidence de marqueurs de tendreté de la viande bovine par des approches de génomique fonctionnelle (projet MUGENE). *Renc. Rech. Rum.*, 117-120.
- Hocquette J.F., Leveziel H., Renand G., Malafosse A., 2007b. The genomics revolution also applies to the bovine genome. *Cahiers Agric.*, 16, 163-169.
- Houbak M.B., Ertbjerg P., Therkildsen M., 2008. *In vitro* study to evaluate the degradation of bovine muscle proteins post mortem by proteasome and mu-calpain. *Meat Sci.*, 79, 77-85.
- Huff-Lonergan E.J., Lonergan S.M., 1999. Postmortem mechanisms of meat tenderization: The roles of the structural proteins and the calpain system. In: *Quality Attributes of Muscle Foods*. C.T.H.a.F.S.Y.L. Xiong (Ed). Kluwer Academic/Plenum Press, New-York, USA, 229-252.
- Jia X., Hollung K., Therkildsen M., Hildrum K. I., Bendixen E., 2006. Proteome analysis of early post mortem changes in two bovine muscle types: *M. longissimus dorsi* and *M. semitendinosus*. *Proteomics*, 6, 936-944.
- Kadanga A.K., Leroux C., Bonnet M., Cassar-Malek I., Hocquette J.F., 2007. Genomic tools to analyse bovine muscle and adipose tissues transcriptomes. *Energy and Protein Metabolism and Nutrition*, 124, 295-296.
- Kee H.J., Park E.W., Lee C.K., 2008. Characterization of beef transcripts correlated with tenderness and moisture. *Molecules and Cells*, 25, 428-437.
- Koohmaraie M., Geesink G.H., 2006. Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Sci.*, 74, 34-43.
- Lametsch R., Karlsson A., Rosenvold K., Andersen H.J., Roepstorff P., Bendixen E., 2003. Postmortem Proteome Changes of Porcine Muscle Related to Tenderness. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 6992-6997.
- Lehnert S.A., Wang Y.H., Byrne K.A., 2004. Development and application of a bovine cDNA microarray for expression profiling of muscle and adipose tissue. *Austr. J. Exp. Agric.*, 44, 1127-1133.
- Lepetit J., 2004. Rôle des tissus conjonctifs dans le déterminisme de la tendreté de la viande. 10^{èmes} Journées des Sciences du Muscle et Technologies de la Viande, Clermont-Ferrand, France, 15-25.
- Lepetit J., Culioli J., 1994. Mechanical properties of meat. *Meat Sci.*, 36, 203-237.
- Lepetit J., Salé P., 1985. Analyse du comportement rhéologique de la viande par une méthode de compression sinusoïdale. *Sciences des Aliments*, 5, 521-540.
- Lestrat A., Lethias C., Hocquette J.F., Renand G., Menissier F., Geay Y., Picard B., 2000. Age-related changes and location of types I, III, XII and XIV collagen during development of skeletal muscles from genetically different animals. *Histochem. J.*, 32, 349-356.
- Lorenzen C.L., Miller R.K., Taylor J.F., Neely T.R., Tatum J.D., Wise J.W., Buyck M. J., Reagan J.O., Savell J.W., 2003. Beef customer satisfaction: trained sensory panel ratings and Warner-Bratzler shear force values. *J. Anim. Sci.*, 81, 143-149.

- Mainsant P., 2003. Meat consumption before and after BSE in France and the European Union. *Sciences des Aliments*, 23, 37-39.
- Maltin C., Balcerzak D., Tilley R., Delday M., 2003. Determinants of meat quality: tenderness. *Proc. Nutr. Soc.*, 62, 337-347.
- McCormick R.J., 1999. Extracellular modifications to muscle collagen: implications for meat quality. *Poult. Sci.*, 78, 785-791.
- Meunier B., Bouley J., Picard B., Bernard C., Picard B., Hocquette J.F., 2005. Data analysis methods for detection of differential protein expression in two-dimensional gel electrophoresis. *Analyt. Biochem.*, 340, 226-230.
- Meunier B., Dumas E., Picard B., Bechet D., Hebraud M., Hocquette J.F., 2007. Assessment of hierarchical clustering methodologies for proteomic data mining. *J. Proteome Res.*, 6, 358-366.
- Monin G., 1991. Facteurs biologiques des qualités de la viande bovine. *INRA Prod. Anim.*, 4, 151-160.
- Morzel M., Gatellier P., Sayd T., Renner M., Laville E., 2006. Chemical oxidation decreases proteolytic susceptibility of skeletal muscle myofibrillar proteins. *Meat Sci.*, 73, 536-543.
- Morzel M., Terlouw C., Chambon C., Micol D., Picard B., 2008. Muscle proteome and meat eating qualities of Longissimus thoracis of «Blonde d'Aquitaine» young bulls: A central role of HSP27 isoforms. *Meat Sci.*, 78, 297-304.
- Nakanishi K., Maruyama M., Shibata T., Morishima N., 2001. Identification of a caspase-9 substrate and detection of its cleavage in programmed cell death during mouse development. *J. Biol. Chem.*, 276, 41237-41244.
- Ouali A., 1991. Conséquences des traitements technologiques sur la qualité de la viande. *INRA Prod. Anim.*, 4, 195-208.
- Ouali A., 1992. Proteolytic and physicochemical mechanisms involved in meat texture development. *Biochimie*, 74, 251-265.
- Ouali A., Talmant A., 1990. Calpains and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal muscles. *Meat Sci.*, 28, 331-348.
- Ouali A., Herrera-Mendez C.H., Coulis G., Becila S., Boudjellal A., Aubry L., Sentandreu M.A., 2006. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Sci.*, 74, 44-58.
- Oury M.P., Picard B., Istasse L., Micol D., Dumont R., 2007. Mode de conduite en élevage et tendreté de la viande bovine. *INRA Prod. Anim.*, 20, 309-326.
- Picard B., Jurie C., Cassar-Malek I., Hocquette J.F., 2003. Typologie et ontogenèse des fibres musculaires chez le bovin. *INRA Prod. Anim.*, 16, 125-131.
- Picard B., Jurie C., Bauchart D., Dransfield E., Ouali A., Martin J.F., Jailler R., Lepetit J., Culiolo J., 2007. Caractéristiques des muscles et de la viande des principales races bovines allaitantes du Massif Central. *Sciences des Aliments*, 27, 168-180.
- Pulford D.J., Vazquez, S.F., Frost D.F., Fraser-Smith E., Dobbie P., Rosenvold K., 2008. The intracellular distribution of small heat shock proteins in post mortem beef is determined by ultimate pH. *Meat Sci.*, 79, 623-630.
- Renand G., Touraille C., Geay Y., Berge P., Lepetit J., Picard B., 1997. Variabilité des qualités organoleptiques de la viande bovine en relation avec les caractéristiques musculaires. *Renc. Rech. Rum.*, 311-314.
- Renand G., Picard B., Touraille C., Berge P., Lepetit J., 2001. Relationships between muscle characteristics and meat quality traits of young Charolais bulls. *Meat Sci.*, 59, 49-60.
- Rhee M.S., Wheeler T.L., Shackelford S.D., Koohmaraie M., 2004. Variation in palatability and biochemical traits within and among eleven beef muscles. *J. Anim. Sci.*, 82, 534-550.
- Savell J.W., Branson R.E., Cross H.R., Stiffler D.M., Wise J.W., Griffin D.B., Smith G.C., 1987. National consumer retail beef study: palatability evaluations of beef loin steaks that differed in marbling. *J. Food Sci.*, 52, 517-519.
- Savell J.W., Mueller S.L., Baird B.E., 2005. The chilling of carcasses. *Meat Sci.*, 70, 449-459.
- Sawdy J.C., Kaiser S.A., St-Pierre N.R., Wick M.P., 2004. Myofibrillar 1-D fingerprints and myosin heavy chain MS analyses of beef loin at 36 h postmortem correlate with tenderness at 7 days. *Meat Sci.*, 67, 421-426.
- Sentandreu M.A., Coulis G., Ouali A., 2002. Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends Food Sci. Technol.*, 13, 400-421.
- Shackelford S.D., Wheeler T.L., Koohmaraie M., 1999. Evaluation of slice shear force as an objective method of assessing beef longissimus tenderness. *J. Anim. Sci.*, 77, 2693-2699.
- Silva J.A., Patarata L., Martins C., 1999. Influence of ultimate pH on bovine meat tenderness during ageing. *Meat Sci.*, 52, 453-459.
- Strydom P.E., Naude R.T., Smith M. F., Scholtz M.M., van Wyk J.B., 2000. Characterisation of indigenous African cattle breeds in relation to meat quality traits. *Meat Sci.*, 55, 79-88.
- Sudre K., Leroux C., Cassar-Malek I., Hocquette J.F., Martin P., 2005. A collection of bovine cDNA probes for gene expression profiling in muscle. *Molecular and Cellular Probes*, 19, 61-70.
- Taylor R.C., Cullen S.P., Martin S., 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 231-241.
- Thomas A.R., Gondoza H., Hoffman L.C., Oosthuizen V., Naude R.J., 2004. The roles of the proteasome, and cathepsins B, L, H and D, in ostrich meat tenderisation. *Meat Sci.*, 67, 113-120.
- Thompson J., Polkinghorne R., 2008. Special Issue: Meat Standards Australia. *Austr. J. Exp. Agric.*, 48, iv + 1351-1480.
- Touraille C., 1994. Incidence des caractéristiques musculaires sur les qualités organoleptiques des viandes. *Renc. Rech. Rum.*, 169-176.
- Underwood K.R., Means W.J., Du M., 2008. Caspase 3 is not likely involved in the post-mortem tenderization of beef muscle. *J. Anim. Sci.*, 86, 960-966.
- Wang Y.H., Reverter A., Mannen H., Taniguchi M., Harper G.S., Oyama K., Byrne K.A., Oka A., Tsuji S., Lehnert S.A., 2005. Transcriptional profiling of muscle tissue in growing Japanese Black cattle to identify genes involved with the development of intramuscular fat. *Austr. J. Exp. Agric.*, 45, 809-820.
- Wheeler T.L., Cundiff, L. V., Koch, R. M., 1994. Effect of marbling degree on beef palatability in *Bos-Taurus* and *Bos-Indicus* cattle. *J. Anim. Sci.*, 72, 3145-3151.
- Wheeler T.L., Shackelford S.D., Johnson L.P., Miller M.F., Miller R.K., Koohmaraie M., 1997. A comparison of Warner-Bratzler shear force assessment within and among institutions. *J. Anim. Sci.*, 75, 2423-2432.
- Wheeler T.L., Shackelford S.D., Koohmaraie M., 1998. Cooking and palatability traits of beef longissimus steaks cooked with a belt grill or an open hearth electric broiler. *J. Anim. Sci.*, 76, 2805-2810.
- Wheeler T.L., Shackelford S.D., Koohmaraie M., 2004. The accuracy and repeatability of untrained laboratory consumer panelists in detecting differences in beef longissimus tenderness. *J. Anim. Sci.*, 82, 557-562.
- Whipple G., Koohmaraie M., Dikeman M.E., Crouse J.D., Hunt M.C., Klemm R.D., 1990. Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. *J. Anim. Sci.*, 68, 2716-2728.
- Zamora F., Debiton E., Lepetit J., Lebert A., Dransfield E., Ouali A., 1996. Predicting variability of ageing and toughness in beef M. *Longissimus lumborum* et *thoracis*. *Meat Sci.*, 43, 321-333.
- Zamora F., Aubry L., Sayd T., Lepetit J., Lebert A., Sentandreu M.A., Ouali A., 2005. Serine peptidase inhibitors, the best predictor of beef ageing amongst a large set of quantitative variables. *Meat Sci.*, 71, 730-742.

Résumé

La tendreté de la viande bovine présente une forte variabilité non maîtrisée qui est à l'origine d'une insatisfaction des consommateurs. De plus, il n'existe pas d'outils fiables et utilisables par la filière bovine pour prédire ce critère de qualité. Depuis de nombreuses années, l'implication des caractéristiques musculaires (collagène, lipides, systèmes protéolytiques, fibres) dans la tendreté a été bien étudiée. Toutefois, lorsque ces caractéristiques sont maîtrisées, il demeure encore une variabilité élevée et non expliquée. Afin d'approfondir les connaissances sur l'origine de cette variabilité, des études de génomique fonctionnelle ont été conduites durant les 10 dernières années. Ces approches permettent de rechercher sans *a priori* des gènes ou des protéines dont l'expression varie en fonction de la tendreté de la viande. Ces études ont permis d'établir une liste de marqueurs biologiques de la tendreté dont l'analyse phénotypique pourra venir compléter les analyses génétiques de recherche de polymorphismes.

Abstract

Control of beef tenderness : identification of biological markers

Beef tenderness exhibits a high and uncontrolled variability which is one reason for the consumer's dissatisfaction. Moreover, the beef industry does not have predictive tools to measure meat tenderness. During the last few years, the impact of muscular characteristics such as collagen, lipids, proteolytic systems and fibres on meat tenderness has been studied. However, there is still an uncontrolled highly variable meat tenderness even when these muscular characteristics are under control. In order to understand this variability, some genomic studies have been conducted during the last 10 years. They allow the screening, without *a priori*, of genes and proteins whose expression is variable with meat tenderness. These studies have established a list of tenderness biomarkers whose phenotypic analyses can complete the polymorphism analyses. This article summarises the current knowledge concerning the phenotypic approach, and will be followed by a second article which will present the genetic approach of beef tenderness markers.

GUILLEMIN N., CASSAR-MALEK I., HOCQUETTE J.-F., JURIE C., MICOL D., LISTRAT A., LEVEZIEL H., RENAND G., PICARD B., 2009. La maîtrise de la tendreté de la viande bovine : identification de marqueurs biologiques. *Inra Prod. Anim.*, 22, 331-344.

AUTHORS PROOF
NOT FOR DISTRIBUTION

Expression of DNAJA1 in bovine muscles according to developmental age and management factors

I. Cassar-Malek^{1†}, N. Guillemin¹, J.-F. Hocquette¹, D. Micol¹, D. Bauchart², B. Picard¹ and C. Jurie¹

¹UR1213, Unité de Recherches sur les Herbivores, Equipe Croissance et Métabolisme du Muscle, INRA, Centre Clermont-Ferrand/Theix, Saint-Genès-Champanelle, France; ²Equipe Nutriments et Métabolismes, INRA, Centre Clermont-Ferrand/Theix, Saint-Genès-Champanelle, France

(Received 18 February 2010; Accepted 7 November 2010)

We have recently shown that the expression of the DNAJA1 gene encoding a heat shock protein (Hsp40) is a negative marker of meat tenderness in Charolais bulls. To acquire knowledge on the regulation of DNAJA1 expression, we analysed the abundance of DNAJA1 transcripts and protein during development and according to management factors (e.g. feeding treatments, growth path and stress status) in different bovine muscles during postnatal life. We report here a developmental expression profile for DNAJA1 with decreased levels of transcript and protein during the progression of myogenesis. During postnatal life, we found the highest expression of DNAJA1 in the most oxidative muscles. No effect was detected for dietary treatment (pasture v. maize-based diet), growth path (compensatory growth after a restriction period) or pre-slaughter stress status. Therefore, the genetic background and muscle type could be considered as the main factors regarding the level of DNAJA1. Integration of the knowledge gained from this study should help to predict muscle metabolic properties and the ability of the live animals to give high sensory quality meat.

Keywords: Hsp40, myogenesis, nutrition, growth path, stress

Implications

Beef is characterized by a high and uncontrolled variability of its sensory attributes, especially tenderness, which is one reason for consumer dissatisfaction. There is still no simple, reliable and reproducible technique to predict quality, which is a limitation to the delivery of a consistent quality meat. Thus, identification of markers of quality attributes is of major socio-economic importance. Recently, we reported that expression of DNAJA1 was a negative tenderness marker. This study examines DNAJA1 expression in bovine muscles having different metabolic specificities during development and according to management factors. It should help to increase knowledge of DNAJA1 expression, and to screen for live animals with favourable muscle properties and potentially high-quality meat.

Introduction

Intrinsic quality attributes of meat quality, especially tenderness, depend on muscle characteristics of live animals and *post mortem* factors associated with ageing and cooking

treatments of meat, which themselves depend on genetic, nutritional and management factors. Thus, it is of interest for rearing or breeding purposes to predict the ability of live animals to produce 'high-quality' meat (Cassar-Malek *et al.*, 2008). In the case of beef, specific attention is paid to tenderness, which is the top priority sensory quality attribute and which depends partly on muscle metabolic properties. Thus, the beef industry is looking for pertinent biological indicators that would identify live animals with desirable quality attributes to direct them towards the most suitable production system. Transcriptomic studies revealed that low expression of the DNAJA1 gene in muscle is associated with elevated beef tenderness (Bernard *et al.*, 2007). Its high expression would therefore be a marker of toughness (Bernard-Capel *et al.*, 2009). The gene encodes a heat shock protein 40 (Hsp40). It is a co-chaperone of Hsp70, an Hsp that is constitutively expressed in mammalian skeletal muscles and quickly induced by a heat stress (Oishi *et al.*, 2002) or exercise-associated increase with contractile activity (Kayani *et al.*, 2008). However, the reason why DNAJA1 is involved in tenderness is still questionable. The protein exhibits an anti-apoptotic activity (Gotoh *et al.*, 2004) and high levels in muscles could delay cell death, an early process occurring post-slaughter in muscle (Ouali *et al.*, 2006). Pre- and postnatal gene expressions

[†] E-mail: cassar@clermont.inra.fr

determine the final outcome of muscle composition, growth and differentiation/maturation, and therefore are critical for meat quality (Hocquette *et al.*, 1998; Greenwood and Cafe, 2007). Currently, few data concern endogenous expression and developmental changes as well as regulation of DNAJA1 expression by exogenous factors. Thus, we designed a study in order to obtain a general understanding of how the gene is regulated throughout development. Here, we investigated intracellular levels of this protein and their corresponding transcripts in bovine muscles having different metabolic specificities in animals during development and according to management factors (e.g. dietary factors, growth curve and stress status at slaughter).

Material and methods

Experimental designs

Muscle foetal development. Charolais fetuses were generated by artificial insemination of Charolais cows with the semens of two Charolais bulls as reported earlier (Chaze *et al.*, 2009). They were collected from cows slaughtered at the Experimental INRA slaughterhouse at pregnancy days 60 ($n = 4$), 110 ($n = 4$), 180 ($n = 4$), 210 ($n = 4$) and 260 ($n = 4$). The *Semitendinosus* (ST) muscle was excised within 15 min, frozen directly in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

Dietary treatments. The experiment was conducted with Charolais steers and the experimental design described earlier (Jurie *et al.*, 2006). Animals were offspring of pure-bred Charolais cows and bulls of an INRA experimental herd (Le Pin au Haras, F61), weaned at 32 weeks and then housed in open sheds. Animals were castrated at 9 months of age. Thirty steers were initially allotted to two groups, 12 animals in a maize group and 18 animals in a grass group. For the second grazing season, groups of animals were formed as follows: 24 animals of which 12 from the grass group and 12 from the maize group were housed in open sheds (a maximum of six animals per pen of 40 m^2 each, and the remaining six animals fed on grass were kept grazing at pasture. For this study, six animals that were given maize-silage *ad libitum*, with a minimum of wheat straw and rapeseed meal allotted in the maize-silage group, and the six animals allotted in the pasture-feeding group were considered. All steers were managed at the same growth rate and were slaughtered at 30 months of age at the Experimental INRA slaughterhouse. The *Rectus abdominis* (RA) and ST muscles, which differ in their contractile and metabolic properties (Talmant *et al.*, 1986), were excised from each animal within less than 15 min after slaughter. Muscle samples were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

Growth path. The experiment was conducted with 42 Montbéliard steers as described earlier (Cassar-Malek *et al.*, 2004). A restriction/refeeding path was designed to induce a discontinuous growth. Practically, at 9 months of age, 21 steers were given a restricted amount of diet for 3 months

and then slaughtered at 12 months of age (R group; $n = 10$; dry matter (DM) intake: 5.3 kg/day per animal) or submitted to an additional 4-month *ad libitum* refeeding period (R/F group; $n = 11$; DM intake: 9 kg/day per animal) with the same diet (11.0 to 11.1 MJ metabolizable energy per kg DM) before slaughter at 16 months of age. In addition, 21 control steers were allowed to gain continuously between 9 and 12 months of age on the same diet. Animals were then slaughtered (C12 group; $n = 10$; DM intake: 7.1 kg/day per animal) or even maintained on a continuous feeding protocol up to 16 months of age and then slaughtered (C16 group; $n = 11$; DM intake: 8.1 kg/day per animal). The *Triceps brachii* (TB) and ST muscles, which differ in their contractile and metabolic properties (Talmant *et al.*, 1986), were excised and treated as described above.

Stress status at slaughter. The experiment was performed with 32 Normand cull cows (48 to 60 months old, mean live weight 642 kg) selected for their live weight, age and body fat score for a 100-day finishing period as described by Gobert *et al.* (2009). Animals were randomly assigned to three isoenergetic and isonitrogenous rations. All rations were given a straw (30%) and concentrate (70%)-based diet supplemented with lipids ($40\text{ g oil/kg DM diet}$) provided by extruded linseed ($n = 6$) or by extruded linseeds (1/3) and rapeseeds (2/3; $n = 10$), or by extruded linseeds associated with antioxidants (vitamin E and plant extracts rich in polyphenols from rosemary, grape, citrus and marigold; 155 IU/kg and 0.7 g/kg DM diet ; $n = 16$) during their finishing period. Two slaughter conditions were used as described in Bourguet *et al.* (2010). Half of the cows from each feeding group were slaughtered at the Experimental INRA slaughterhouse under limited stress (LS) conditions (7-min transport to the abattoir located at 2 km from the experimental farm). Cows under LS conditions (LS group; $n = 16$) were accompanied in the lorry by a non-experimental companion to avoid social isolation stress). They were immediately slaughtered after unloading. The other half of the cows from each feeding group were submitted to stress conditions (S group; $n = 16$). Stress conditions consisted in additional physical exercise and psychological stress. Cows were individually transported towards an unfamiliar farm (15 min transport) and unloaded at the entrance of a labyrinth and taken through three times (28 min accompanied by two purposely noisy experimenters), and finally they were individually transported to the abattoir (15-min transport) where they were immediately slaughtered. The *Longissimus thoracis* (LT) and ST muscles, which differ in their contractile and metabolic properties (Talmant *et al.*, 1986), were excised and treated as described above.

In all experimental designs, experimental procedures and animal holding facilities respected French animal protection, and were approved by the French veterinary services.

Immunodetection of DNAJA1 protein

Extraction of total muscle proteins was performed in a denaturation buffer (8.3 M urea , 2 M thiourea , 1% DTT, 2% CHAPS) as described by Bouley *et al.* (2004). Muscle protein

concentration was determined by spectrophotometry with the Bradford assay (Bradford, 1976). Total extracted proteins were stored at -20°C before analysis. A monoclonal primary antibody (SPM251; sc-56400, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) was used for DNAJA1 immunodetection.

Western blot analysis. Western blot analysis was performed according to the method of Guillemain *et al.* (2009). Briefly, 15 μg of total extracted proteins were separated in 1 day in a 12% polyacrylamide gel at 120 V, at 4°C for 90 min in the Mini-Protean apparatus (BioRad, France). Proteins were then transferred to a PVDF membrane Millipore (Dutscher Dominique SAS, Brumath, France) with Trans-Blot Cell apparatus (BioRad, France) at 210 mA at 4°C for 60 min. The PVDF membrane was incubated in a 10% milk-blocking buffer at 37°C for 20 min to block non-specific binding and thereafter in the primary antibody solution (SPM251, TEBU BIO ref sc-56400, dilution 1/250). The blots were then incubated with a secondary antibody (IgG anti-mouse NX931, GE Healthcare) conjugated with horseradish peroxidase (dilution: 1/20000). Enzyme activity was revealed by ECL Western Blotting Kit (Perbio Science France SAS, Brerbières, France). Western blot images were quantified under ImageQuant TL v2003 (Amersham).

Dot Blot analysis. Dot Blot analysis was performed as described by Guillemain *et al.* (2009). Briefly, 15 μg of total extracted proteins were deposited on a nitrocellulose membrane with Minifold I Dot Blot apparatus (Shleicher & Schuell Bioscience, Germany). All samples were loaded randomly in quadruplicate. A mixed sample consisting of a pool of all samples was used as a standard for data normalization. Dot Blot membranes were air-dried for 5 min, blocked in 10% milk blocking buffer at 37°C for 20 min, and then incubated with the primary antibody (SPM251, TEBU BIO ref sc-56400, dilution 1/250). Secondary fluorescent-conjugated IRDye 800CW antibody (anti-mouse) was supplied by LI-COR Biosciences (Lincoln, Nebraska, USA) and used at 1/20000. Then the membranes were scanned by the scanner Odyssey (LI-COR Biosciences, USA) at 800 nm. Protein abundance for each sample, given in arbitrary units, was normalized according to a mix of different samples, used as a reference. Protein quantification was performed by infrared fluorescence detection. Dot Blot images were quantified under GenePix PRO v6.0 (Axon).

Detection of DNAJA1 transcripts

DNAJA1 gene expression was performed by quantitative RT-PCR (qPCR) as described by Bernard *et al.* (2007) using the primer pair Fw: AGGGTCGCCTAATCATTGAA and Rev: TCCTCGTATGCTTCTCCATTG. Briefly, total RNA was extracted from muscles using Trizol reagent (LifeTechnologies). RNA was then purified and treated with DNase using the RNeasy[®] Mini kit (Qiagen, France) and its integrity checked using Lab Chip Agilent technology (Agilent Technologies, Palo Alto, USA). qPCR was realized using SYBR Green I dye in the StepOne Plus System (Applied Biosystems). The reaction

was subjected to melting curve analysis to confirm single amplified products. The Real-Time PCR experiment was controlled using the CDH11 gene (FW: GGGTCCCTGAGCTCCT TAGA and Rev: AGATTCCTCAGAACGCCAGA as described by Bernard *et al.* (2009)) and the TBP gene (FW: CCTAAA GACCATTGCACTTCG and Rev: CTTCACCTCTGGCTCCTGTGG) as internal references for the postnatal and foetal periods, respectively. Data were expressed relative to the amount of cDNA, using a standard dilution curve. The quantity (arbitrary units) of transcripts was determined by using a linear relationship between amounts of standards cDNA and their Ct (Cycle threshold).

Enzyme activities

Maximal activity levels of enzymes reflecting the glycolytic (phosphofructokinase, PFK, lactate dehydrogenase, LDH) and oxidative (isocitrate dehydrogenase, ICDH, cytochrome-c oxidase, COX) metabolic pathways were determined by spectrophotometry according to the methods cited by Jurie *et al.* (2006). One unit of the enzyme was defined as the amount which catalyses per minute the disappearance of 1 μmol of NADH for PFK and LDH, the reduction of 1 μmol of NADP for ICDH, and the oxidation of 1 μmol of cytochrome-c for COX. Results are expressed in $\mu\text{mol}/\text{min}$ per gram of fresh tissue.

Statistical analysis

All statistical analyses were conducted using the GLM procedure of SAS.

For expression of the DNAJA1 protein during muscle foetal development, the effect of foetal age was tested in the model.

For each experimental design (feeding treatments, growth path or stress status), data were analysed in a model that contained the effects of the management factor considered, muscle, animal tested within the management factor and the muscle $\times$ management factor interaction. The animal variation was used as the error term for the 'management factor considered' effect. The pre-planned contrast was used to evaluate the impact of stress status.

From the data for each experimental design (feeding treatments, growth path or stress status), since no muscle $\times$ management factor interaction was detected, only the main effects are reported in the tables. All results were presented as adjusted means with appropriate standard errors of means (s.e.). The adjusted means for DNAJA1 transcripts were adjusted for the CDH11 or TBP level (the statistical model contained the CDH11 or TBP level as a covariate; Hocquette and Brandstetter, 2002). When significant effects were detected, differences between adjusted means were further evaluated by the PDIF option of SAS. A difference between groups was considered significant when $P < 0.05$.

Results

Expression during development

The abundance of the DNAJA1 protein in the ST muscle according to the foetal age is presented in Figure 1 (A and B). Significant changes were observed all through pregnancy

(age effect: $P < 0.001$). Muscle DNAJA1 protein was the highest at day 60, decreased by 1.6-fold between days 60 and 110 ($P < 0.01$), and by 2-fold between days 110 and 180 ($P < 0.01$). Then it decreased, although not significantly, between days 180 to 210 and 260. Accordingly, the abundance

of DNAJA1 transcripts (Figure 1C) also decreased between days 60 and 260 ($P < 0.001$).

Influence of management factors

As mentioned earlier, no 'muscle $\times$ management factor' interaction was detected, and therefore only the main effects (muscle, feeding regimen, growth path and stress status) were considered.

Feeding treatments. Muscle abundance of the DNAJA1 protein and its transcripts did not significantly differ between feeding treatments (pasture v. maize-silage-based diet, $P = 0.13$). Protein abundance was 4.2-fold higher ($P < 0.001$) in RA than in ST muscle (Table 1); however, no difference in the transcript abundance was noted between both muscles.

Growth path. Muscle data from animals in the dietary restriction period and the refeeding period were analysed separately (Table 2). After the dietary restriction period, DNAJA1 protein abundance was reduced by 2-fold in the muscles of restricted compared to control animals ($P = 0.02$) without any change in the abundance of transcripts ($P = 0.43$). No significant difference in protein abundance could be detected at 16 months at the end of the compensatory period ($P = 0.28$). Muscle protein abundance was two times higher in TB than in ST muscle whatever the dietary restriction ($P = 0.002$) or the refeeding period ($P < 0.001$; Table 2). Accordingly, the level of DNAJA1 transcripts was higher in TB than in ST muscle at the end of the restriction period ($P < 0.001$). The level of transcripts in muscles after the refeeding period was not examined.

In order to test in the model the effects of the age and muscle type, we performed a statistical analysis with only the control groups (C12 and C16). Effects of the muscle type ($P < 0.001$), age ($P = 0.05$) and the 'age $\times$ muscle' interaction ($P = 0.10$) were noted for protein abundance (data not shown in table) with a reduction by 1.6-fold in the control group (0.31 v. 0.19) between 12 and 16 months of age. The decrease was higher in ST than in TB muscle.

Stress status. The influence of pre-slaughter stress on muscle metabolism and DNAJA1 protein abundance was investigated. Glycolytic enzyme activities (LDH and PFK) were not different,

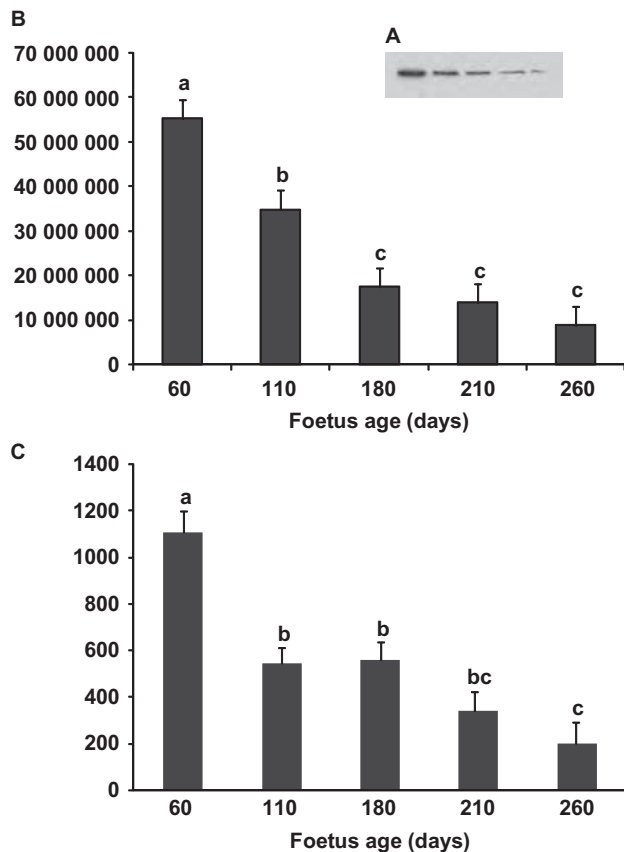


Figure 1 Expression of DNAJA1 during bovine foetal myogenesis. (A, B) Abundance of the DNAJA1 protein: the protein was detected by Western blot in the ST muscle of foetuses ($n = 4$) at five key developmental stages (pregnancy days 60, 110, 180, 210 and 260). (A) Representative Western blot showing DNAJA1 expression; (B) Western blots were quantified by densitometric analysis. (C) Abundance of the DNAJA1 transcripts: DNAJA1 transcripts were quantified by qPCR, using a linear relationship between the amount of standard cDNA and the cycle threshold. (B, C) Data are expressed as least squares means $\pm$ s.e. (arbitrary units) for DNAJA1 mRNA levels adjusted for TBP levels (the statistical model contained TBP levels as a covariate). ^{a,b,c}Mean values with different superscript letters are significantly different among ages ($P < 0.05$).

Table 1 Influence of feeding treatments (pasture-feeding v. maize-silage) on the abundance of DNAJA1 protein and transcript in RA and ST muscles of Charolais steers

	Feeding regimen		s.e.	P-value	Muscle		s.e.	P-value
	Pasture-feeding	Maize-silage			RA	ST		
Protein	0.61	0.79	0.08	0.13	1.13	0.27	0.08	<0.001
Transcript	10.92	10.47	0.85	0.8	10.44	10.95	0.65	0.6

RA = Rectus Abdominis; ST = Semitendinosus.

No 'muscle $\times$ feeding regimen' interaction was detected. Abundance of the DNAJA1 protein and transcript was analysed by Western blot and qRT-PCR, respectively in the muscles of steers fed on pasture ($n = 6$) v. on a maize-silage diet ($n = 6$). Results are presented as least squares means $\pm$ s.e. (arbitrary densitometry units) for protein abundance and least squares means $\pm$ s.e. (arbitrary units) for DNAJA1 mRNA levels adjusted for CDH11 levels (the statistical model contained CDH11 levels as a covariate).

Table 2 Influence of the growth path on the abundance of DNAJA1 protein and transcript in TB and ST muscles of Montbéliard young steers

	Dietary restriction		s.e.	P-value	Muscle		s.e.	P-value
	C12	R			TB	ST		
Protein	0.31	0.17	0.04	0.02	0.32	0.16	0.03	0.002
Transcript	4.79	5.65	0.73	0.46	7.84	2.59	0.51	<0.001
	Refeeding		s.e.	P-value	Muscle		s.e.	P-value
	C16	R/F			TB	ST		
Protein	0.19	0.26	0.04	0.28	0.39	0.06	0.04	<0.001

TB = *Triceps Brachii*; ST = *Semitendinosus*.

No 'muscle $\times$ growth path' interaction was detected. Abundance of the DNAJA1 protein and transcript was analysed by Western blot and qRT-PCR, respectively in the muscles of steers. C12 ($n = 10$) and C16 ($n = 11$), control steers slaughtered at 12 and 16 months of age, respectively; R ($n = 10$), restricted steers slaughtered at 12 months of age; R/F ($n = 11$), restricted/refed steers slaughtered at 16 months of age. Results are presented as least squares means $\pm$ s.e. (arbitrary densitometry units) for protein abundance and least squares means $\pm$ s.e. (arbitrary units) for DNAJA1 mRNA levels adjusted for CDH11 levels (the statistical model contained CDH11 levels as a covariate).

Table 3 Influence of the stress status on the metabolic enzyme activities and the abundance of DNAJA1 protein in LT and ST muscles of Normand cull cows

	Stress status		s.e.	P-value	Muscle		s.e.	P-value
	S	LS			LT	ST		
Enzyme activities								
PFK	232	244	11	0.46	220	256	4	<0.001
LDH	1003	1042	22	0.22	1039	1006	9	0.07
ICDH	1.19	1.01	0.08	0.10	1.22	0.98	0.05	0.0009
COX	21.9	18.8	1.2	0.08	21.5	19.1	0.9	0.07
DNAJA1								
Protein	14.3	14.4	0.5	0.84	15.8	12.9	0.5	0.001

LT = *Longissimus Thoracis*; ST = *Semitendinosus*; PFK = phosphofructokinase; LDH = lactate dehydrogenase; ICDH = isocitrate dehydrogenase; COX = cytochrome-c oxidase.

No 'muscle $\times$ stress status' interaction was detected. Activities of metabolic enzymes were assayed in the muscles of the stressed group (S; $n = 16$) and limited stress group (LS, $n = 16$) according to Jurie *et al.* (2006). Results are presented in $\mu\text{mol/min per g}$. Abundance of the DNAJA1 protein was analysed by Dot blot in the experimental groups according to Guillemin *et al.* (2009). Results are presented as least squares means $\pm$ s.e. (arbitrary densitometry units).

and oxidative enzyme activities tended to be higher (ICDH $P = 0.10$ and COX $P = 0.08$) in muscles of animals submitted to pre-slaughter stress (S) than in animals with LS. No significant difference was observed for muscle DNAJA1 protein abundance according to the stress status (Table 3). Significant differences were only recorded between muscles. Muscle oxidative enzyme activity (ICDH) and DNAJA1 protein abundance were higher by 24.5% and 22.5%, respectively ($P < 0.001$), in LT than in ST muscle. Conversely, muscle glycolytic enzyme activity (PFK) was 16.4% higher in ST than in LT muscle ($P < 0.001$; Table 3).

Discussion

In this study, we analysed the kinetics of DNAJA1 expression during bovine foetal myogenesis and investigated the impact of management factors during postnatal life. DNAJA1 belongs to the DNAJ proteins (Hsp40s) family consisting of over 40 members in humans, as revealed by a genome-wide analysis. These proteins are involved in cellular protein

trafficking (specifically into the mitochondria and endoplasmic reticulum), are positive co-chaperones of HSP70, and have an Hsp activity (Qiu *et al.*, 2006).

Developmental expression of DNAJA1

Little is known about the expression profile of Hsp40s during the development of tissues and this was the first study examining the DNAJA1 gene expression pattern during muscle development. Some DNAJ proteins can be expressed specifically in a tissue alone or some others universally in all tissues. In some cases, a tissue-specific expression was achieved through alternatively spliced transcripts. In mice, nDNAJA1 (a new splicing isoform of DNAJA1) was shown to be highly expressed in the testis and spermatogenic cells, whereas other spliced forms were highly expressed in other tissues (Terada *et al.*, 2005). In addition, it was more highly abundant in adult than in foetal testes (Terada *et al.*, 2005). In mice, loss of DNAJA1 led to severe defects in spermatogenesis (Hu *et al.*, 2004), suggesting its critical role for spermatogenesis. DNAJA3, a mitochondrial Hsp40 was found to be

differentially expressed during cardiac development and pathological hypertrophy (Hayashi *et al.*, 2006) and its crucial role for mitochondrial biogenesis was hypothesized.

In this study, we showed for the first time a regulation of the DNAJA1 expression in muscle during foetal myogenesis. Abundance of protein and transcripts was the highest at pregnancy day 60, a stage when muscle fibres mainly belong to the primary generation from which slow fibres originate (Picard *et al.*, 2002). Then, it markedly decreased especially from day 180 of gestation, a crucial period for determination of the total number of muscle fibres. Finally, muscle DNAJA1 protein abundance was low and stable during the phase of intense contractile and metabolic differentiation of skeletal muscles (Cassar-Malek *et al.*, 2007). The lowest level of protein and transcripts was detected at the end of the gestation period. Although speculative, changes in DNAJA1 expression could be related to its cellular activities (e.g. chaperone and anti-apoptotic factor). As DNAJ proteins would assist Hsp70 in the folding and compartmentalization of nascent proteins (Vos *et al.*, 2008), a high level of DNAJA1 protein could first reflect its role of a molecular co-chaperone limiting the number of misfold proteins in muscles undergoing high protein synthesis during intensive fibre formation and tissue remodelling. The decrease in DNAJA1 expression may be linked to the progressive dilution of the first generation of fibres by the secondary generation of fibres during development (Picard *et al.*, 2002). Since DNAJA1/Hsp70 played a protective role against apoptosis (Gotoh *et al.*, 2004), the age-related decrease noted for muscle DNAJA1 protein could also hallmark the acquisition of the resistance phenotype of muscle to apoptosis during the progression of myogenesis (Walsh, 1997).

Thus, this study showed that DNAJA1 expression was regulated throughout foetal myogenesis, a period critical for lifelong programming and for the construction of meat quality through different mechanisms.

Differential expression of DNAJA1 protein according to muscle types

In our series of experiments, we observed the highest DNAJA1 expression in the most oxidative muscles (TB, RA > ST, LT; Jurie *et al.*, 2006; Oury *et al.*, 2010) both at the protein and transcript levels. In another study conducted in Charolais, abundance of DNAJA1 was negatively correlated with LDH in the ST and LT, and positively correlated with oxidative enzyme activities (e.g. ICDH and citrate synthase, CS) in the ST (Guillemain, personal communication). Oxidative muscles are known to have a higher potential for 'oxidative stress' than glycolytic muscles. More abundantly expressed Hsp (e.g. Hsp70 and Hsp27) in oxidative than glycolytic muscles (Locke *et al.*, 1991; Hamelin *et al.*, 2006; O'Neill *et al.*, 2006) would play a crucial role in the protection of tissues against oxidative stress. It is therefore not surprising that the abundance of DNAJA1, a key partner of Hsp70, was higher in these muscles. In addition, oxidation and reduction pathways reversely regulated DNAJA1 function in response to cell redox state (Choi *et al.*, 2006).

Dietary regulation of DNAJA1 expression

On the basis of differences between muscle types, changes in DNAJA1 expression may reflect a shift in muscle metabolism and anti-oxidant status. However, the lack of effect of the feeding treatments on the expression of DNAJA1 was unexpected, since in animals on pasture an orientation of muscle metabolism towards the oxidative type was observed (Jurie *et al.*, 2006; Cassar-Malek *et al.*, 2009).

However, the lower muscle DNAJA1 abundance at the end of the restriction period probably reflected a higher anti-oxidant status induced by the feed restriction, although no change in oxidative metabolism was noted in the ICDH, COX and CS activities (Cassar-Malek *et al.*, 2004). Accordingly, Sreekumar *et al.* (2002) reported that an energy restriction would induce production of gene transcripts of the free radical scavenger pathway, suggesting a decrease in oxidative stress and downregulated transcript levels of genes involved in stress response/chaperone function (e.g. Hsp70, stress-inducible protein GrpE, DnaJ-like protein (RDJ1) and chaperonin 60). Reversed increase in protein levels during the compensation could be linked to a higher oxidative metabolism (Cassar-Malek *et al.*, 2004). Since no significant change in DNAJA1 transcripts was observed with the growth path, the differential effect of food restriction and then of food compensation on protein and transcript levels is still unclear. It possibly results from subtle changes in translational mechanisms, for example, mRNA stability and/or translational efficiency (Clarke and Abraham, 1992).

Relationships with stress and meat quality

Several studies have shown that a variation in meat quality may be explained to a large extent by pre-slaughter emotional stress in pigs (Terlouw *et al.*, 2005) and cattle (Lowe *et al.*, 2004; Gobert *et al.*, 2009). Different studies showed that Hsps were related to beef quality since significant correlations were found between the abundance of either Hsp transcript or protein and tenderness (Bernard *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008; Morzel *et al.*, 2008). Therefore, a key issue addressed by this study was to investigate whether the animals more stressed before slaughter could have a differential DNAJA1 expression correlated to variations in beef quality. Interestingly, we did not find any relation between the stress status of animals at slaughter and the abundance of DNAJA1. This indicated that the level of DNAJA1 protein cannot be considered as an indicator of stress status in bovine muscles, at least in standardized conditions. Since cattle spend various times at the slaughterhouse before being slaughtered, further evaluation of DNAJA1 expression in muscle samples collected at different times of rest following stress exposure could elucidate if the gene does not at all respond to stress.

Lastly, meat tenderness is determined from the contributions of connective tissue, sarcomere length, muscle fibre properties determined *pre-rigor* and rate of proteolysis during ageing, as well as from contributions from intramuscular fat and *post-mortem* energy metabolism (Warner *et al.*, 2010). However, all these factors vary to a great extent

between muscle types, which explains why muscle type is the biggest determinant of quality. Thus, the differential expression of heat shock proteins, including DNAJA1, may contribute to the variability of beef quality across cuts. However, if DNAJA1 expression is correlated with tenderness scores intra muscle (Bernard *et al.*, 2007), they very likely do not account for the differences in tenderness between two broiler muscles (the LT is more tender but with higher DNAJA1 expression than the ST).

Conclusion

In this study, we analysed the influence of factors related to the animal (muscle, age) and its growth curve on DNAJA1 expression. The highest expression of DNAJA1 was detected in the youngest animals and the most oxidative muscles. It varied according to the growth curve but not to feeding treatments. Interestingly, the abundance of the tenderness marker does not appear to be modulated by pre-slaughter stress, a crucial determinant for meat toughness. This should help to predict the animal muscle properties, and hence their aptitude to produce high-quality beef, when still alive, to orientate them into suitable production systems and therefore to guarantee constant meat quality.

Acknowledgements

The authors thank N. Dunoyer, G. Gentes and C. Nore for their skilled collaboration and the technical staff of the experimental slaughterhouse and experimental facilities of INRA at URH and the Pin au Haras. This work has been performed within the EU FP6 Integrated Project ProSafeBeef, contract FOOD-CT-2006-36241. The financing of the work by the European Union is gratefully acknowledged for laboratory analyses. Animals and samples were funded through INRA grants in the context of internal programmes of the Herbivore Research Unit entitled 'Grass and Meat' and ANR grant (for the LIPVIMUS project: ANR-06-PNRA-018).

References

- Bernard C, Cassar-Malek I, Renand G and Hocquette J-F 2009. Changes in muscle gene expression related to metabolism according to growth potential in young bulls. *Meat Science* 82, 205–212.
- Bernard C, Cassar-Malek I, Le Cunff M, Dubroeuq H, Renand G and Hocquette J-F 2007. New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 5229–5237.
- Bernard-Capel C, Cassar-Malek I and Hocquette J-F 2009. Genomic marker for tenderness meat. United States Patent Application Publication no. US 2009/0311689 A1.
- Bouley J, Chambon C and Picard B 2004. Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 4, 1811–1824.
- Bourguet C, Deiss V, Gobert M, Durand D, Boissy A and Terlouw EMC 2010. Characterising the emotional reactivity of cows to understand and predict their stress reactions to the slaughter procedure. *Applied Animal Behaviour Science* 125, 9–21.
- Bradford MM 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Cassar-Malek I, Picard B, Kahl S and Hocquette J-F 2007. Relationships between thyroid status, tissue oxidative metabolism, and muscle differentiation in bovine fetuses. *Domestic Animal Endocrinology* 33, 91–106.
- Cassar-Malek I, Picard B, Bernard C and Hocquette J-F 2008. Application of gene expression studies in livestock production systems: a European perspective. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 48, 701–710.
- Cassar-Malek I, Jurie C, Bernard C, Barnola I, Micol D and Hocquette J-F 2009. Pasture-feeding of Charolais steers influences skeletal muscle metabolism and gene expression. *Journal of Physiology and Pharmacology* 60 (suppl.), 83–90.
- Cassar-Malek I, Hocquette J-F, Jurie C, Lustrat A, Jailler R, Bauchart D, Briand Y and Picard B 2004. Muscle-specific metabolic, histochemical and biochemical responses to a nutritionally induced discontinuous growth path. *Animal Science* 79, 49–59.
- Chaze T, Meunier B, Chambon C, Jurie C and Picard B 2009. Proteome dynamics during contractile and metabolic differentiation of bovine foetal muscle. *Animal* 3, 980–1000.
- Choi H-I, Lee SP, Kim KS, Hwang CY, Lee Y-R, Chae S-K, Kim Y-S, Chae HZ and Kwon K-S 2006. Redox-regulated cochaperone activity of the human DnaJ homolog Hdj2. *Free Radical Biology and Medicine* 40, 651–659.
- Clarke SD and Abraham S 1992. Gene-expression – nutrient control of pretranscriptional and posttranscriptional events. *FASEB Journal* 6, 3146–3152.
- Gobert M, Bourguet C, Terlouw C, Deiss V, Berdeaux O, Comte B, Gruffat D, Bauchart D and Durand D 2009. Pre-slaughter stress and lipoperoxidation: protective effect of vitamin E and plant extracts rich in polyphenols given to finishing cattle. In 11th International Symposium on Ruminant Physiology (ed. Y Chilliard, F Glasser, Y Faulconnier, F Bocquier, I Veissier, M Doreau), p. 814. Wageningen Pers., Wageningen, The Netherlands.
- Gotoh T, Terada K, Oyadomari S and Mori M 2004. Hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death and Differentiation* 11, 390–402.
- Greenwood PL and Cafe LM 2007. Prenatal and pre-weaning growth and nutrition of cattle: longterm consequences for beef production. *Animal* 1, 1283–1296.
- Guillemin N, Meunier B, Jurie C, Cassar-Malek I, Hocquette J-F, Leveziel H and Picard B 2009. Validation of a dot-blot quantitative technique for large scale analysis of beef tenderness biomarkers. *Journal of Physiology and Pharmacology* 60, 91–97.
- Hamelin M, Sayd T, Chambon C, Bouix J, Bibe B, Milenkovic D, Leveziel H, Georges M, Clop A, Marinova P and Laville E 2006. Proteomic analysis of ovine muscle hypertrophy. *Journal of Animal Science* 84, 3266–3276.
- Hayashi M, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Wood M, Earns C, Tatake RJ and Lee JD 2006. A crucial role of mitochondrial Hsp40 in preventing dilated cardiomyopathy. *Nature Medicine* 12, 128–132.
- Hocquette J-F and Brandstetter AM 2002. Common practice in molecular biology may introduce statistical bias and misleading biological interpretation. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 370–377.
- Hocquette J-F, Ortigues-Marty I, Pethick D, Herpin P and Fernandez X 1998. Nutritional and hormonal regulation of energy metabolism in skeletal muscles of meat-producing animals. *Livestock Production Science* 56, 115–143.
- Hu Y, Zhou Z, Huang X, Xu M, Lu L, Xu Z, Li J and Sha J 2004. Expression of a novel DnaJA1 alternative splicing in human testis and sperm. *International Journal of Andrology* 27, 343–349.
- Jurie C, Ortigues-Marty I, Picard B, Micol D and Hocquette J-F 2006. The separate effects of the nature of diet and grazing mobility on metabolic potential of muscles from Charolais steers. *Livestock Science* 104, 182–192.
- Kayani AC, Morton JP and McArdle A 2008. The exercise-induced stress response in skeletal muscle: failure during aging. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism* 33, 1033–1041.
- Kim N, Cho S, Lee S, Park H, Lee C, Cho Y, Choy Y, Yoon D, Im S and Park E 2008. Proteins in longissimus muscle of Korean native cattle and their relationship to meat quality. *Meat Science* 80, 1068–1073.
- Locke M, Noble EG and Atkinson BG 1991. Inducible isoform of HSP70 is constitutively expressed in a muscle fiber type specific pattern. *American Journal of Physiology – Cell Physiology* 261, C774–C779.
- Lowe TE, Devine CE, Wells RW and Lynch LL 2004. The relationship between postmortem urinary catecholamines, meat ultimate pH, and shear force in bulls and cows. *Meat Science* 67, 251–260.
- Morzel M, Terlouw C, Chambon C, Micol D and Picard B 2008. Muscle proteome and meat eating qualities of Longissimus thoracis of "Blonde d'Aquitaine" young bulls: A central role of HSP27 isoforms. *Meat Science* 78, 297–304.

- O'Neill DET, Aubrey FK, Zeldin DA, Michel RN and Noble EG 2006. Slower skeletal muscle phenotypes are critical for constitutive expression of Hsp70 in overloaded rat plantaris muscle. *Journal of Applied Physiology* 100, 981–987.
- Oishi Y, Taniguchi K, Matsumoto H, Ishihara A, Ohira Y and Roy RR 2002. Muscle type-specific response of HSP60, HSP72, and HSC73 during recovery after elevation of muscle temperature. *Journal of Applied Physiology* 92, 1097–1103.
- Ouali A, Herrera-Mendez CH, Coulis G, Becila S, Boudjellal A, Aubry L and Sentandreu MA 2006. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Science* 74, 44–58.
- Oury MP, Dumont R, Jurie C, Hocquette J-F and Picard B 2010. Specific fibre composition and metabolism of the rectus abdominis muscle of bovine Charolais cattle. *BMC Biochemistry* 11, 12.
- Picard B, Lefaucheur L, Berri C and Duclos MJ 2002. Muscle fibre ontogenesis in farm animal species. *Reproduction Nutrition Development* 42, 415–431.
- Qiu XB, Shao YM, Miao S and Wang L 2006. The diversity of the DNAJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63, 2560–2570.
- Sreekumar R, Unnikrishnan J, Fu A, Nygren J, Short KR, Schimke J, Barazzoni R and Nair KS 2002. Effects of caloric restriction on mitochondrial function and gene transcripts in rat muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 283, E38–E43.
- Talmant A, Monin G, Briand M, Dadet M and Briand Y 1986. Activities of metabolic and contractile enzymes in 18 bovine muscles. *Meat Science* 18, 23–40.
- Terada K, Yomogida K, Imai T, Kiyonari H, Takeda N, Kadomatsu T, Yano M, Aizawa S and Mori M 2005. A type I DNAJ homolog, DjA1, regulates androgen receptor signaling and spermatogenesis. *EMBO Journal* 24, 611–622.
- Terlouw EMC, Porcher J and Fernandez X 2005. Repeated handling of pigs during rearing. II. Effect of reactivity to humans on aggression during mixing and on meat quality. *Journal of Animal Science* 83, 1664–1672.
- Vos MJ, Hageman J, Carra S and Kampinga HH 2008. Structural and functional diversities between members of the human HSPB, HSPH, HSPA, and DNAJ chaperone families. *Biochemistry* 47, 7001–7011.
- Walsh K 1997. Coordinate regulation of cell cycle and apoptosis during myogenesis. *Progress in Cell Research* 3, 53–58.
- Warner RD, Greenwood PL, Pethick DW and Ferguson DM 2010. Genetic and environmental effects on meat quality. *Meat Science* 86, 171–183.

Biographical Sketches



Dr Brigitte Picard is a meat scientist. She obtained a PhD degree in biochemistry in 1990 and is currently developing research on muscle growth and cattle meat quality. She manages programs on markers of beef tenderness (a biological integrative approach associating biochemical studies, functional genomics (proteomics), and modeling). Her competencies include muscle physiology, analysis of proteins (electrophoresis mono- and two-dimensional, Western-blot, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and immunohistochemistry), primary cultures of muscle cells (myoblasts and satellite cells), and proteomic analysis of muscle. She manages an INRA team on muscle growth and metabolism of the UR1213 Herbivores Research Unit.



Dr Isabelle Cassar-Malek is a research scientist at the INRA Herbivore Research Unit. She has a broad expertise in myogenesis, especially in cattle. Her researches are focused on the determinants of muscle mass with special interest for myostatin and satellite cell functions. She also investigates some aspects of the cross talk between muscle cells and adipocytes with M. Bonnet, and is involved in programs on beef quality, studying, in particular, the muscle characteristics in relation to meat quality. Her current work aims at identifying expression markers of muscle hypertrophy and of sensory attributes through integrative biology analyses combining genomics (transcriptomics and proteomics with B. Picard), molecular biology (quantitative polymerase chain reaction (PCR), protein detection), bioinformatics, cell cultures (muscular primary cells and cell line cultures), and gene inactivation experiments. The final purpose is to reveal, in cattle and in mice models, some key cellular or metabolic pathways involved in muscle growth and meat quality.



Nicolas Guillemin is a PhD student in molecular biology at the INRA Herbivore Research Unit since 2008, under the direction of Brigitte Picard, and will be graduated at the end of 2010. His research area is beef-tenderness proteomics. He developed a new immunological technique of dot-blot to quantify targeted proteins in muscle samples. His work validated the abundance of some protein markers with beef tenderness, to develop prediction equations. He contributed to explain tenderization mechanisms by integrative biology approaches. His competencies are in: proteomics analysis (Western-blot, dot-blot), bioinformatics analysis (interactomes and databases), and muscle physiology at the molecular level.



Muriel Bonnet obtained a PhD degree in biochemistry, biology, and nutrition in 1999. She has expertise in adipose tissue differentiation, metabolism, and endocrine function in ruminants, as well as in some aspects of the cross talk between tissues: nutrient partitioning between adipose tissue and muscle and leptin signaling between adipose and mammary cells during the pregnancy-lactation cycle. Her current research activity dealing with regulation of lipid depots in adipose tissues and skeletal muscle in growing ruminants can be divided into two scientific areas. The main goal of the first area is to get a better understanding of the mechanisms that control adipocyte development in adipose tissues and skeletal muscle. The main purpose of the second area is to evaluate the impact of rearing factors on adipose tissue development.

a0005

4.46 Quest for Novel Muscle Pathway Biomarkers by Proteomics in Beef Production

B Picard, I Cassar-Malek, N Guillemin, and M Bonnet, INRA, St. Genès Champanelle, France

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

4.46.1	Introduction and Scope	1
4.46.2	New Insights in Muscle Biology	2
4.46.2.1	Muscle Hypertrophy	2
4.46.2.2	Myogenesis	3
4.46.2.3	Regulation of Myogenesis	5
4.46.3	Identification of Markers of Beef Tenderness	7
4.46.4	Conclusion	10
References		10

Glossary

d0005

mass spectrometric (MS) methods They are used for protein identification with different techniques by references to national databases.

two-dimensional (2-D) electrophoresis This technique combines a first separation of proteins by electrophoresis, according to their isoelectric point, and a second separation based on their molecular weight.

d0010

s0005

4.46.1 Introduction and Scope

p0015

The proteome is the protein complement of the genome and consists of the total amount of proteins expressed at a certain time point in a specific tissue [48]. In the last few years, proteomic tools became very useful not only in a variety of studies in medicine, but also in agronomy, particularly in livestock species for meat production [36]. Genome sequencing realized in several species including cattle provides useful knowledge for proteomics.

p0020

The main proteomic techniques used over the last few years included two-dimensional (2-D) gel electrophoresis (2-DE) combining a first separation of proteins according to their isoelectric point and a second separation based on their molecular weight. With this technique, numerous differential studies have been performed. In 2-D gels' analysis, conventional staining methods with dyes such as Coomassie Brilliant Blue have been widely used for quantification. The development of a differential fluorescent labeling method (2-D DIGE) allowed to increasing technical reproducibility [45]. In this technique, prior to 2-DE, two protein samples to be compared are covalently labeled with different fluorescent dyes and then mixed and subjected to 2-DE. The comparison consists in the analysis of the ratio between the fluorescence intensities of two spots from the two samples. This method has the advantage of not comparing data from two gels.

p0025

2-DE for proteomic analysis has some limitations such as not being able to detect low abundance proteins, as the amount of sample that can be loaded on 2-D gel is limited [21, 47]. Some highly abundant proteins could also overlap weaker protein spots. Moreover, some proteins (such as membrane proteins or hydrophobic ones) have properties that make them difficult or impossible to be well resolved in 2-D gels. In addition, proteins with low molecular masses are difficult to detect by 2-DE. Moreover, conventional 2-DE cannot detect protein-protein interactions and protein functions. Thus, other approaches are used to enable a comprehensive understanding of cellular mechanisms at the protein level. For this purpose, more efficient proteomic approaches based on mass spectrometry (MS) and informatics has been developed.

p0030

The introduction of MS methods drastically reinforced protein identification strategies. Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) and electrospray ionization (ESI) allowed to measure well the molecular masses of proteins. An alternative method for protein identification using MS and database is tandem MS analysis. However, tandem *de novo* sequencing using MS data can be used. The multi-dimensional chromatographic system is also applicable in high-throughput tandem MS analysis (for review see Reference 49). Genome-sequencing and annotation data have allowed implementing public databases for bioinformatic tools. During the last few years, much progress has occurred in bioinformatics with the development of several World Wide Web sites or analysis tools, such as PROWL, Protein prospector, peptideSearch, Sherpa, Mascot, Uniprot, HPRD, MINT, IntAct, and MIMI, devoted to (1) protein identification by the comparison of peptide mass fingerprints with sequence databases; (2) the collection, storage, and sharing of identified proteins; or (3) of protein-protein interactions [33, 49]. The exponential accumulation of data has led to the development of bioinformatic tools that integrate the large volume of data as networks, i.e., graphs that represent biomolecular interactions within a cell. Numerous software have been developed for the analysis and construction of different biological networks that can be represented by different types of graphs [33]. These computational approaches facilitate prediction of the functions of uncharacterized proteins as well as prediction of functional interactions.

- p0035 As expression levels of messenger RNA (mRNA) are not necessarily correlated with those of the encoded proteins [1], proteomics allows to distinguish several isoforms of a protein with differences in molecular weight and isoelectric point (pI) values, which can originate from alternative splicing of mRNA as illustrated by the troponin T isoforms involved in muscle contraction [9]. Using 2-DE, these authors detected 17 troponin T isoforms in the bovine *Semiteminosus* muscle (ST, mixed fast glycolytic), 11 of them belonging to the fast type (fTnT) and originating from the exclusive alternative splicing of fTnT exon 16 and fTnT exon 17. After translation, a large part of proteins are modified by post-transcriptional modifications such as phosphorylation, methylation, acetylation, nitration, sulfatation, glycosylation, fatty acids addition, and ubiquitination leading to either attainment of their proper functions at proper locations or degradation. Analysis of these modifications is often essential for determining the roles of proteins in biological pathways. For example, the large phosphopeptide databases generated by proteomics provide new insights into signaling pathways that are active during development [2, 50].
- p0040 Proteomics can also be used to map proteins of a tissue. First, proteome mapping was described for different species. For example, a separation of proteins from ST bovine muscle in a pH gradient of 4–7 in the first dimension allowed the detection of roughly 500 reproducible protein spots [8]. Among them, 129 were identified and mapped. This first map was completed with the development of a separation in a basic gradient 7–11, allowing the mapping of 60 proteins [12]. Combining both methods, we are able to separate bovine proteins with pI comprised between 4 and 11 pH units with a good resolution and reproducibility. Proteomics has been used also for comparative analysis in different topics.
- p0045 Over the past years, proteomic tools were used for various applications including in muscle and meat science (for reviews see References 3, 26, and 36). The applications range from studies of genetic variation, muscle types, response to feeding, pre-slaughter conditions, processing conditions, aging, storage conditions, and quality traits. In most of these studies, 2-DE has been used in combination with MS identification of specific proteins. In this review, we will focus on cattle proteome used in order to allow a better management of beef production.

s0010 4.46.2 New Insights in Muscle Biology

- p0050 One of the aims of meat production is to increase muscle mass, which is dependent on the number and size of the fibers and thus on the mechanisms underlying muscle growth by hyperplasia (increase in numbers of fibers and/or hypertrophy (enlargement of muscle fiber)). As a prerequisite to improving muscle mass, current studies aim to identify proteins involved in the control of hyperplasia and hypertrophy. Comparative proteomic analyses applied to muscles of meat-producing animals differing by the conditions of their rearing or by their genotypes were proved to be a powerful tool to achieve these aims [36]. For example, in cattle, Shibata *et al.*, [42] regarding the sarcoplasmic fraction of ST muscle found greater amounts of several glycolytic enzymes (enolase 3, fructose-1,6-bisphosphate aldose A and triphosphatase isomerase) in concentrated-fed versus grazing cattle. A significant increase in myoglobin necessary for oxygen transport in muscle was also found in grazing cattle. In concordance with that, abundances of enzymes of aerobic metabolism were increased in the grazing group. These data suggest that conversion to slow-twitch from fast-twitch muscle tissues occurred in the myofibrillar fraction in the ST muscle in the grazing cattle.
- p0055 Comparative proteomic analysis can provide novel candidates for the control of biological pathways. An example will be given with the understanding of the origin of muscle hypertrophy using different animal models with the final aim to understand muscle hypertrophy in cattle.

s0015 4.46.2.1 Muscle Hypertrophy

- p0060 A key issue for meat production is to increase the muscle mass. This could be done by using specific genotypes with high muscle-growth potential including double-musled cattle and divergently selected cattle lines [37]. We have studied the muscle proteome of two models of cattle with muscle hypertrophy from different origins: monogenic (Belgium Blue double-musled bulls, heterozygote (HDM) or homozygotes (DM) for myostatin mutation vs. non-double-musled (NDM)) or polygenic (divergent lineages of charolais bulls: with high (H) or low (L) muscle growth rate). Among the proteins differentially expressed in DM muscle, the differential proteomic analysis of ST muscle revealed two proteins involved in metabolic pathways, for example, phosphoglucosmutase (PGM) and heart fatty-acid-binding protein (H-FABP). The abundance of three proteins, for example, sarcosin, sarcoplasmic reticulum 53kDa glycoprotein (R53G) and p20 was significantly altered. Eight differential proteins were related to contractile apparatus including myosin-binding protein H (MyBP H); several myosin light chains including MLC2, MLC3, MLC2s, MLC1sa, and MLC1sb; and troponin T isoforms including slow TnT and fast TnT. In the muscles of DM cattle, the TnT isoforms containing the exon 16 appeared predominantly expressed. The ratio fTnT exon 16/fTnT exon 17 (Figure 1) was proposed to be a good marker of muscle mass [9]. Proteome changes demonstrated a shift toward a fast-twitch glycolytic muscle type in animals with myostatin mutation in coherence with previous data. An intermediate level of protein expression was generally found in HDM muscle.
- p0065 A similar analysis conducted on ST muscle from H and L young bulls revealed that the proteins differentially expressed in DM muscle were also differentially expressed in H muscle except for H-FABP (decreased only in DM muscle) and protein R53G (overexpressed only in DM muscle). These data indicate that the high muscle-growth potential of monogenic origin (DM) or that obtained by divergent selection induces an increased abundance of fast glycolytic proteins.

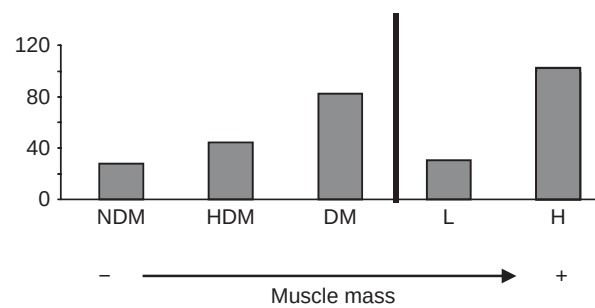


Figure 1 Relationship between the ratio of the proportion of troponin T fast isoforms (fTnT) from exon 16 and exon 17: fTnT16/fTnT17 and muscle mass in Belgium Blue homozygotes double-musced (HDM), heterozygotes double-musced (HDM), and non-double-musced (NDM); and in charolais selected on high (H) or low (L) muscle growth potential, according to Bouley *et al.* [9].

Accordingly, Hamelin *et al.* [22] examined the proteome profiles in four muscles of Texel sheep harboring a quantitative trait locus (QTL) for muscle hypertrophy, which revealed 63 differential spots compared with Romanov sheep without any myostatin mutation. Most proteins could be related to the hypertrophic status of the muscle and the associated increased levels of glycolytic enzymes and lower capillary density, respectively.

The glycolytic shift of the muscles and the downregulation of proteins involved in oxidative energy metabolism in ruminants were also observed in a model of rodent hypertrophy in myostatin-null mice [17]. In addition, the use of this model allowed revealing the increased abundances of survival/anti-apoptotic factors (e.g., DJ-1, PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1), 14-3-3 ϵ protein, and translocationally controlled tumor protein/glycogen synthase kinase (TCIP/GSK-3 β)). This indicated that regulators of the PI3K pathway and cell survival/apoptosis likely contribute to muscle hypertrophy. This was confirmed in muscles from double-musced cattle [18].

4.46.2.2 Myogenesis

With the aim to identify proteins involved in muscular hyperplasia and hypertrophy, several studies have focused on proteome changes during muscle development also called myogenesis. The first studies have been performed mainly on myoblast cultures, such as C2C12. Kislinger *et al.* [29] identified 1865 proteins differentially expressed across myoblast proliferation and differentiation. The main changes in proteome profiles were observed at the beginning of differentiation and were associated with modifications of cell morphology. Then, Tannu *et al.* [44], using 2-DE and MS, revealed 653 myoblast-specific proteins and 558 myotube-specific proteins. More precisely, 213 and 144 proteins, respectively, from myoblasts and myotubes corresponded to membrane fractions, 413 and 276 to the nuclear fraction. Only 106 identified proteins showed a differential amount associated with myoblast-to-myotube transition. The main actors of differentiation identified were pAkt, PKB, p38, pERK, serine/threonine protein kinase Akt2/PKB, IGF1 receptor, and caspase3. Puente *et al.* [39] confirmed an important role of several serine/threonine kinases in myogenesis. They showed that phosphorylation pathways are essential for the regulation of expression of Akt and myocyte enhancer binding factors MEF2 and MEF2C. To complete this knowledge, Puente *et al.* [39] analyzed the phosphoproteome of C2C12 cells during differentiation. This led to the discovery of 132 proteins, including moesin, Arp2/3, and caldesmone, for which phosphorylations were associated with myogenesis. Some of these proteins are involved in the caspase-dependent apoptosis pathway. This study has been completed by the construction of an interactome of phosphorylated proteins involved in myogenesis. This demonstrated that proteins such as mitogen-activated protein kinase (MAPK), Akt, c-jun N-terminal kinase (JNK1), and CDK5 are essential for the adequate progression of myogenesis. Chan *et al.* [10] applying separation by monodimensional electrophoresis and MS of proteins extracted from C2C12 in proliferation showed that numerous proteins migrated in the extracellular matrix: moesin, fibronectin, and pro-collagen. They demonstrated that several proteins such as serpin, PEDF, Annexin 1, and Galectin 1 had an important role in cellular migrations.

In complement, different studies have been performed *in vivo* on muscle samples in order to compare levels and/or isoform shifts of protein between different stages not only in several species such as zebrafish, *Drosophila*, mouse, and chick but also in livestock species (for review see References 36 and 40). In the present review, we will focus on cattle myogenesis.

In order to improve knowledge of the dynamics of cattle muscle development, a proteomic analysis was conducted in ST muscle from charolais fetuses at five crucial ages. These ages were chosen according to the developmental changes described in Picard *et al.* [38]: 60 days post conception (dpc), proliferation of the first generation of myoblasts; 110 dpc, proliferation of the second generation of myoblasts and differentiation of the first generation; 180 dpc, end of proliferation, differentiation of myotubes; 210 and 260 dpc, contractile and metabolic maturation of fibers. The proteomic approach revealed 496 spots common to these five ages. Among these spots, principal component analysis and hierarchical clustering analysis of proteome dynamics revealed 245 proteins for which abundance changed (Figure 2).

The first age (60 dpc) was characterized by a higher abundance of proteins involved in embryonic development, regulation of cell growth and organization, biogenesis, and tissue development. Among them, RhoA GDP/GTP nucleotide dissociation inhibitor (RhoGDI) alpha protein, involved in cytoskeleton reorganization during cell proliferation, is highly expressed at this age.

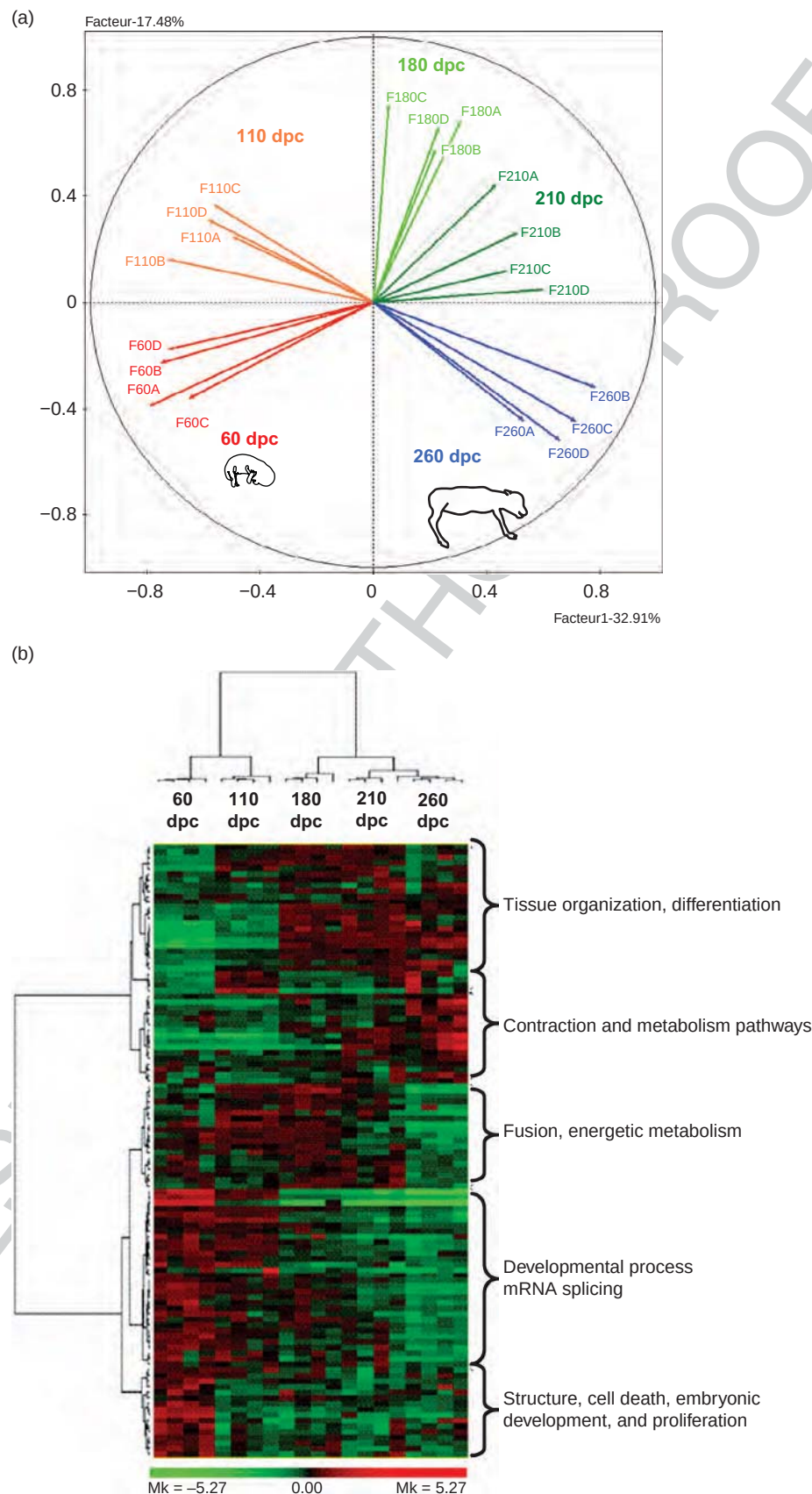
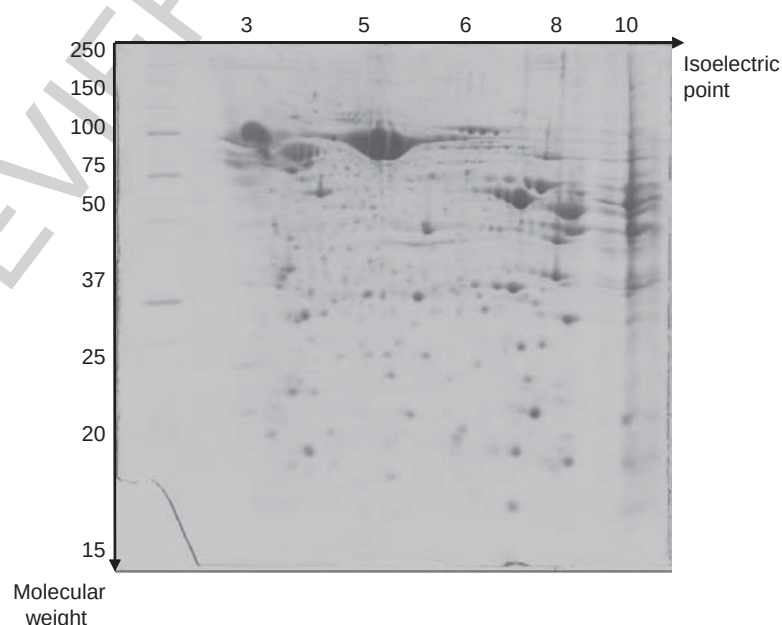


Figure 2 (a) Principal component analysis of proteomic data allowing a discrimination of the different stages from proteomic data; and (b) hierarchical clustering analysis on the 245 proteins common to the five developmental stages, according to Chaze *et al.* [16] (in green are shown the less abundant proteins, in red the most abundant proteins).

- p0100 The second age 110 dpc was the most complex as it regroups most of the Gene Ontology (GO) terms from proliferation to differentiation, including fusion. This is coherent with the fact that, at this age, muscle contains different cell populations at different physiological stages, as primary fibers are differentiating whereas secondary myoblasts are proliferating [38]. For example, Galectin 1 showed a peak of expression at this stage, in accordance with its implication in myoblast fusion as described by Georgiadis *et al.* [20].
- p0105 The stage 180 dpc was mostly characterized by the GO terms cell differentiation, generation of precursor metabolites and energy, cell–cell signaling, cell development, and vitamin metabolism in accordance with the fact that this age is a transition age between the setup of muscular tissue and its differentiation fate. From this stage, the total number of fibers is fixed [38]. Two proteins, Stathmin (with an important role in cell cycle regulation and which expression decreased on 180 days post conception) and Annexin A1 (with an anti-proliferative function by the activation of extracellular signal regulatory kinase (ERK) pathways), confirmed the pivotal role of 180 dpc between proliferation of tissue during the first two-thirds of fetal life and its differentiation during the last third.
- p0110 During the two first trimesters of gestation corresponding to an increase in the number of muscle fibers, many proteins involved in proliferation and apoptosis were overexpressed, indicating a crucial role of the balance between proliferation/apoptosis in the determination of the total number of fibers [14]. Among them, many (e.g., RuvBLike2, heterogeneous nuclear ribonuclear protein K (hnRNP K), WARS, chloride intracellular channel protein (CLIC4), and PARK7) have been proposed as effective or putative interactors of proto-oncogenes such as p53 or c-myc.
- p0115 Many changes were recorded in the profiles of protein isoforms from metabolic and contractile pathways during the last trimester of gestation [15]. These results provided new insights regarding proteins such as aldehyde dehydrogenase family, enolase, dihydrolipoyl dehydrogenase, troponin T or myosin light chains, which profiling is associated with the differentiation and maturation of fibers.

s0025 4.46.2.3 Regulation of Myogenesis

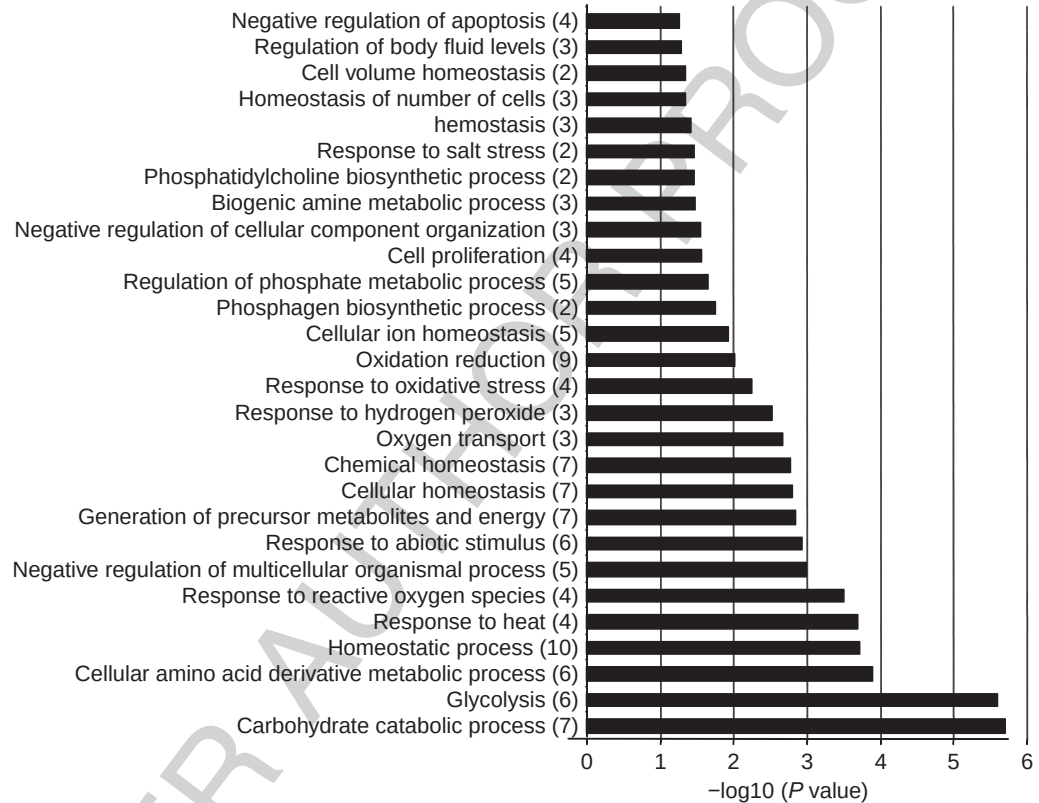
- p0120 To complement our knowledge on mechanisms that control muscle growth in cattle, we used proteomic analysis to identify proteins secreted by muscle after injury. Skeletal muscle has an exceptional capacity for self-repair that is largely dependent on satellite cells, a population of resident stem cells identified between fibers [11]. The proliferation and differentiation of satellite cells serve not only muscle self-repair but also muscle hypertrophy by adding new DNA to the existing fibers. The proliferation and differentiation of satellite cells are induced in response to growth stimuli that remain not well known, probably because of the heterogeneity in the satellite cell population [4]. A way to identify these growth stimuli and/or the proteins secreted in response to growth stimuli and/or injury is the use of saline extracts produced by incubation of gently crushed or stretched muscles that have been shown to trigger satellite cell reentry into the cell mitogenic cycle [5]. We used proteomics (3–10 pH gradient in the first dimension and 11% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in the second dimension of gel electrophoresis) to identify active factors present in crushed muscle extract (CME), as, to date, they are only partially characterized [23, 32]. We generated CME from crushed *longissimus thoraci* muscle of 260 dpc-old charolais fetuses [35]. Among the 896 spots that were separated and mapped by 2-DE (Figure 3), we identified by MS 95 spots corresponding to 76 proteins, but no growth factors, which are generally not easily detected in 2-D gels due to their low abundance.



f0015 **Figure 3** Separation of proteins from crushed muscle extract of longissimus thoracis muscle from 260 day-old charolais fetus, in a 3–10 pH gradient in the first dimension and 11% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) gel electrophoresis in the second dimension. Coloration Coomassie Blue.

Nevertheless, we identified proteins such as ANXA7 that was reported to be modulated by platelet-derived growth factor (a mitogen of satellite cells) in rat vascular smooth muscle cells [19]. The most significant GO term for biological process that was associated with the identified proteins is 'carbohydrate catabolic process' (Figure 4), which encompassed seven proteins, among which six were enzymes of glycolysis (ENO1, ENO3, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), lactate dehydrogenase-B (LDHB), triosephosphate isomerase 1 (TPI1), and phosphoglycerate kinase 1 (PGK1)). This result complements

GO terms, biological process category



GO terms, molecular function category

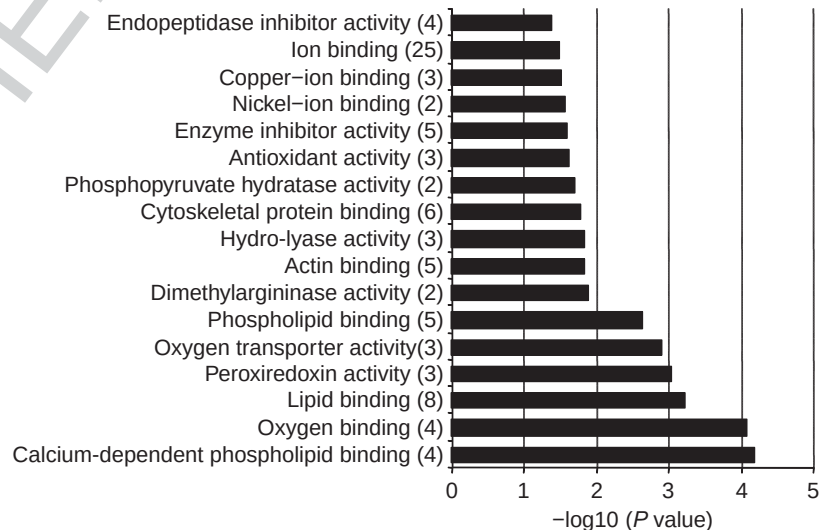


Figure 4 The identification of enriched Gene Ontology (GO; www.ncbi.nlm.nih.gov) terms (biological process and molecular function categories) was done with DAVID (version 6.7 [27]) web-based platforms. We present results obtained with DAVID and the enrichments were expressed as $-\log_{10}(p\text{-value})$ to visualize them on graphs, which means that $\log_{10}(p\text{-value})$ of 3, 2, and 1.3 correspond to p -values of 0.001, 0.01, and 0.05, respectively. The results for biological process and molecular function categories concern the annotation of 53 and 65 bovine proteins, respectively. In brackets is the number of proteins within the GO terms annotation.

those described above and highlights that the fact that carbohydrate metabolism is a central player of myogenesis acting both on muscle growth and regeneration. Other proteins were annotated with the GO term 'response to heat', 'response to abiotic stimulus', and 'response to oxidative stress', which may be proteins such as heat shock protein (HSPB6), CRYAB, HSPB1, and superoxide dismutase (SOD1) expressed logically after injury and involved in self-repair mechanism (Figure 4). We also identified proteins that were annotated with the terms 'cell proliferation', 'homeostasis of number of cells', and 'negative regulation of apoptosis', among which were proteins (14-3-3 ϵ protein, PARK7, Rho GDP-dissociation inhibitor 1, etc.) that were proposed to be involved in the balance proliferation/apoptosis during fetal myogenesis [14] or in models of muscle hypertrophy [17]. The GO term annotation related to the molecular function highlighted the abundance of proteins with a binding activity (Figure 4). These data show that active factors present in bovine CME are proteins that may interact with cytoskeletal proteins including actin, with lipids and phospholipids or with ions. These proteins may act on cytoskeletal-membrane-matrix connections, on the abundance of free intracellular calcium, and on calcium-responsive pathways that have been proposed to be some of the mechanisms of muscle degeneration, regeneration, and repair [46]. Among the identified and annotated proteins, 25 were proposed to interact with ions, which may be in line with the abundance of calcium-dependent proteins involved in muscle repair [46]. For example, Annexins are calcium-dependent, phospholipid-binding proteins that participate in membrane repair. We identified in bovine CME, ANXA2, a member of the Annexin family that was shown to associate in a calcium-dependent manner to dysferlin, a major mediator of membrane resealing in muscle [31]. These preliminary results suggest that proteomics aid in the identification of the proteins present in CME and provide new insights about proteins that may be involved in muscle degeneration, regeneration, and repair, and thus on satellite cells functioning.

AU6
p0130

Muscle mass not only results from muscle growth, but also from the growth of muscle relative to other major tissues in the body such as adipose tissue (AT). There is indeed striking evidence for developmental and functional links between muscle and AT: the successive waves of growth of muscle and AT suggest a priority for muscle growth, and, in double-musled Belgian Blue cattle, increased muscular development is concomitant with a decrease in the carcass and muscular AT [6]. Thus, adipose and muscle cells seem to be linked by competition or prioritization in their commitment, differentiation, and/or uptake and metabolism of nutrients, all of which determine their number and size. Yet, and whatever the species, few studies have directly considered the reciprocal links between muscle and AT [6]. Indirect identification of the developmental and functional links between muscle and AT would be made possible by the understanding of the cellular and molecular processes involved in their respective growth, especially during the fetal period that comprises muscular growth through both hyperplasia and hypertrophy (and not exclusively the post-natal hypertrophy). Unfortunately and conversely to muscle, studies on fetal AT growth are scarce [6]. We used a proteomic analysis combining 2-DE and mass spectrometry to identify proteins expressed *in vivo* in perirenal AT from charolais and blond d'aquitaine fetuses at four fetal ages. These ages were similar to those previously used for proteomic analysis of muscle ontogenesis [14, 15], namely 110, 180, 210, and 260 dpc. The proteomic approach revealed around 1600 proteic spots among which 261 spots were common to these four fetal ages. Statistical analysis and hierarchical clustering analysis of proteome dynamics during the 9 months of gestation revealed 233 proteic spots corresponding to 128 identified proteins whose abundance changed [43]. The integration of the data obtained for muscle and AT during their ontogenesis is under process and would allow the identification of pathways that are (1) specific to either muscle or adipose tissue and (2) common to the both tissues, which is a prerequisite for the understanding of the mechanisms underlying the adipose-muscular cross talk.

AU7

s0030 4.46.3 Identification of Markers of Beef Tenderness

p0135 Proteomics, in the study of meat sensory quality in general and of tenderness in particular, is of great interest not only to help understand the complex muscular systems that govern tenderness and its variability, but also to identify tenderness markers. A protein marker can be defined as a protein, whose presence and/or activity is responsible for the phenotype being studied, and which is easy to visualize and quantify.

p0140 In the proteomic profiling (2-D gels and MS) performed on bovine longissimus dorsi (LT) muscle by Sawdy *et al.* [41] 36 h post-mortem, seven bands visible on 2-D gels correlated positively with the degree of tenderness 7 days after slaughter. Two of these bands were identified as bovine myosin heavy chain fragments (MyHC). The results showed that degradation of myofibrillar proteins, in this case MyHC, plays an important role in meat tenderness. In addition, analysis of the degradation of these proteins 36 h after slaughter would be a good indicator of tenderness at 7 days, and even enable classification of carcasses according to their degree of tenderness.

p0145 A comparison of the proteomic profiles of two bovine muscles, the LT (tender), and ST (tough) was carried out by Jia *et al.* [28] at slaughter ($T = 0$) and 24 h later ($T = 24$). Thirteen protein spots were differentially expressed in the LT muscle and 18 in the ST, in the time lapse. In both muscle types, there was a decrease in levels of: cofilin, SP-22 substrate for mitochondrial adenosine triphosphate (ATP)-dependant protease, and heat shock proteins Hsp27 and Hsp20. There was a more striking decrease in the levels of cofilin (known to promote actin polymerization) in ST. Several Hsp27 isoforms were observed, and the expression of one of these dropped dramatically in LT muscle. Hsp27 and Hsp20 are chaperone proteins implicated in the organization and protection of myofibrils, and they are localized to the Z and I disks of sarcomeres. The expression of the metabolic enzyme lactoylglutathione lyase, involved in the lactic acid pathway, rose in particular in ST [28]. This enzyme reflects the transition to anaerobic metabolism after slaughter.

p0150 The protein differences observed between the two muscle types remain to be correlated with the distinct differences in tenderness in LT and ST muscles. Expression of the glycolytic enzyme TPI dropped in LT. This enzyme is related to tenderness in pork [30]. In ST, levels of structural proteins such as actin $\alpha 1$ and tubulin α chain dropped. In this same muscle, the abundance of proteasome

subunits also decreased. As the proteasome is ATP dependant, the disappearance of ATP could be the cause of the decrease. The potential role of the proteasome in post-mortem aging is still unclear; it may contribute to aging thereby favoring tenderness. The expression of other proteins such as t-complex polypeptide 1 (TCP1), 14-3-3 γ and kinase 14 also decreased as a result of the disappearance of ATP. The contribution of these proteins to the development of tenderness remains unknown.

p0155 This study highlights the physiological and metabolic differences in two different muscle types (LT and ST) from the same animal. Different degrees of tenderness are derived from distinct and similar factors in the different muscle types, which highlights the role of some proteins. Many more studies will be needed to gain a better insight into the mechanisms underlying tenderness.

[AU8] p0160 Bouley [7], using comparative proteomics, researched for markers of beef tenderness on ST muscle of three different French beef breeds: charolais (C), limousin (L), and salers (S). For each breed, the young bulls were classified according to tenderness of their meat estimated by sensory analysis: high or low. The results showed that for the C breed, 10 proteins were expressed differentially between the two groups with differing tenderness, five proteins for the L breed, and five proteins for the S breed (Table 1). Furthermore, in the charolais breed, six proteins were associated with the contractile apparatus: MyBP-H, fTnT, sTnT, MLC1, MLC2-P, and MLC2. Parvalbumin (PV) is implicated in the calcium cycle and Hsp27 is a small chaperone protein. Another small-sized protein could not be identified. In the L breed, two proteins (MyBP-H and MLC2) were associated with the contractile apparatus, PV was associated with the calcium cycle, Acetyl CoA binding protein (ACBP) with the acetyl-CoA cycle; and the small unidentified protein was again found. For the S breed, two proteins including phosphoglucosmutase (PGM) and lactate dehydrogenase (LDH-B) formed part of the glycolytic cycle. The SR53G protein is associated with the calcium cycle, and modification of its expression could be linked to muscle contraction and to calcium-dependant protease activity. PV is also associated with the calcium cycle, and correlated positively with tenderness. None of the differentially expressed proteins were observed in all three breeds. Consequently, it seems that the tenderness determinant differs according to breed. However, the beef breeds (C and L) seem to differ from the hardy race (S); the meat of the latter is more susceptible to oxidation and metabolizes glycogen to a lower extent. These results demonstrate that proteins involved in the calcium cycle seem to play a role in determining tenderness. For example, the ACBP protein is involved in acyl-CoA metabolism, and is likely to play a role in the calcium cycle, and therefore influence

t0005

Table 1 Proteins with a differential in abundance between groups of tenderness in *Semiteminosus* muscle of young bulls from the three breeds: charolais, limousin, and salers from the study of Bouley *et al.* (2004)

<i>Charolais</i>	
<i>Protein</i>	<i>Ratio of abundance</i>
Phosphoglucosmutase (PGM)	-2
Myosin-binding protein H (MyBP-H)	2.1
Fast troponin T (fTnT) exon 17	2
Slow troponin T (sTnT)	2.3
Myosin light chain 1 A isoform (MLC1sa)	2
Myosin regulatory light chain2 skeletal muscle isoform (MLC2-P)	2.5
Myosin regulatory light chain2 skeletal muscle isoform (MLC2)	-2.4
Parvalbumin (PV)	7.8
Heat shock protein 27 (Hsp27)	-2
Non-identified (pI 5.7/8 kDa)	2.2
<i>Limousin</i>	
<i>Protein</i>	<i>Ratio of abundance</i>
Myosin-binding protein H (MyBP-H)	2
Myosin regulatory light chain2 skeletal muscle isoform (MLC2)	-2.1
Parvalbumin (PV)	3.5
Acyl-coA binding protein (ACBP)	2.2
Non-identified (pI 5.7/8 kDa)	2.5
<i>Salers</i>	
<i>Protein</i>	<i>Ratio of abundance</i>
Phosphoglucosmutase (PGM)	-2.5
Lactate dehydrogenase B chain (LDH-B)	-2.1
Sarcoplasmic reticulum 53kDa glycoprotein (SR53G)	-8
Heat shock protein p20	-2.1
Non-identified (pI 6.5/65 kDa)	2.1

-: protein less abundant in the group of high tenderness.

+: proteins more abundant in the group of high tenderness.

Table 2 List of proteins correlated with muscle mass and tenderness in *Semiteminosus* muscle according to Bouley *et al.* (2004) and Bouley *et al.* (2005)

Protein		Correlation hypertrophy/ tenderness
p20 014558, spot 122	p20	Negative/negative (S)
Slow troponin T (low Mr)	sTnT	Negative/positive (C)
Fast troponin T exon 17	fTnT	Negative/positive (C)
Myosin light chain 1, isoform A	MLC1a	Negative/positive (C)
Sarcoplasmic reticulum 53-kDa glycoprotein	SR53G	Positive (double-muscled only)/ negative (S)
Phosphoglucumutase	PGM	Positive (double-muscled only)/ negative (C, S)
Myosin Regulatory lightchain 2, skeletal muscle isoform (phosphorylated, spot 135)	MLC2-P	Positive/positive (C)
Parvalbumin	PV	Positive/positive (C, L)
Myosin-binding protein H	MyBP-H	Positive/positive (C, L)

C: charolais, L: limousine, and S: salers.

In bold are the proteins with the same sign of correlation with tenderness and muscle mass.

tenderness. Overexpression of the Hsp27 chaperone protein increases the stability of actin, the degradation of which is important for the development of meat tenderness during aging [8].

The combined results of Bouley [7] on markers of tenderness and Bouley *et al.* [9] on markers of muscle hypertrophy, bring to light the proteins that are linked to both tenderness and muscle mass (Table 2). Some proteins can have either a positive or negative effect on both tenderness and muscle hypertrophy. These proteins are of particular interest because changes in their expression brought about by different breeding practices can increase the muscular mass of an animal and enhance meat tenderness at the same time. Among these proteins, we can mention MLC2-P, PV, and MyBP-H, which are positive markers of muscle mass and of tenderness. On the contrary, the protein p20 is a negative marker.

These different studies prove the importance and reliability of proteomics in the analysis of tenderness. However, meat tenderness is a multifactorial process; varying degrees of tenderness are reported in different breeds of animals, muscle types, and breeding practices. Therefore, other proteomic studies were performed on other muscles and in other settings (genetics and breeding practices), in order to complete the work of Bouley *et al.* [9].

Study of the bovine Longissimus thoracis muscle proteome by Morzel *et al.* [34] showed that an abundance of succinate dehydrogenase is positively correlated to tenderness ($r = 0.81$). This Krebs-cycle mitochondrial enzyme, associated with oxidative fibers, may predict tenderness. The results demonstrate that the amount of proteins degraded, such as actin, creatine kinase, α B-crystallin, and Hsp27 (thought to serve as substrates in *post-mortem* proteolysis), increases during aging.

In live animals, high levels of Hsp27 protect actin from degradation. However, after slaughter, proteolysis of actin increases. In fact, Hsp27 plays a role in preventing protein aggregation, thereby favoring access of proteases to their targets. Proteolysis during aging is thus facilitated, while consequently increasing tenderness. Hsp27 may well be a potentially interesting marker of tenderness, as high concentrations of this protein in live animals are linked to improved tenderness after aging. The role of α B-crystallin and desmin is comparable to that of Hsp27.

The MUGENE (French ANR Genanimal-APIGENE) research program allowed identification of tenderness and toughness markers in LT muscle of charolais young bulls. The results are in agreement with those presented previously [25]. Fast TnT, PGM, fast MyHC isoforms, and glycogen phosphorylase were markers of toughness. On the other hand, APOBEC, slow MyHC isoform, and ATP synthase β chain were markers of tenderness.

Complementarily, the QUALVIGENE (French ANR Genanimal-APIGENE) program identified markers of tenderness and toughness in LT muscle in the three principal French beef breeds: blonde d'aquitaine, charolais, and limousin [13]. In blonde d'aquitaine, fast TnT, β -enolase, α B-crystallin, and Hsp20 were identified as negative markers of tenderness and myosin regulatory light chain 2 and CapZ- β as positive markers. In charolais breed, we revealed MLC2, PGM, and fast TnT as negative markers of tenderness and DJ-1 and glutathione S-transferase P as positive markers. In limousin, β -enolase, CapZ- β , stress-induced phosphor protein 1, glyceraldehyde-3-phosphatide hydrogenase (GADPH), and DJ-1 were negative markers of tenderness and α -enolase, α -B crystallin chain, and Hsp20 were positive ones.

This study shows that proteins indicative of tenderness differ from one breed to the other, but the underlying cellular mechanisms are similar and are in agreement with previous studies.

All these proteomic data have permitted the study of numerous bovine muscle profiles and has linked tenderness to protein abundance. However, the results demonstrate large variations in muscle protein content in different breeds, animals, and muscle types (see results of Bouley [7], Sawdy *et al.* [41], Jia *et al.* [28], and Morzel *et al.* [34]). Some proteins, for example, TPI or MyLC are linked to tenderness in several studies. Others, such as Hsp27, are negatively correlated to tenderness according to Bouley [7] and

Herrera-Mendez *et al.* [24], but their presence in the animal before slaughter is necessary for tenderness according to Morzel *et al.*

[34]. The mechanisms controlling tenderness are far from being elucidated and a more comprehensive overview will be possible only after detailed studies of different bovine muscles and of the role of heat shock proteins in particular.

p0205 The applications of these studies will concern the construction of an immunological tool, such as antibody micro-array with specific antibodies corresponding to all the proteins revealed as markers of tenderness. This tool will allow to estimate the tenderness potential of a muscle on live animals or on carcass.

s0035 4.46.4 Conclusion

p0210 In contrast to the genome, the proteome is continuously changing according to factors influencing either protein synthesis or degradation. In this regard, for beef production, the proteome can be seen as the molecular link between the genome and the functional characteristics of the meat, being expressed from the genome under environmental/processing conditions. While the genome contains the information on which genes are available, the proteome contains information on which genes are actually being expressed. Thus, understanding the variations of the muscle proteome with regard to beef quality will lead to knowledge that can be used in optimizing beef production in quantity and quality, particularly tenderness.

References

- bib0005 [1] Anderson L and Seilhamer J (1997) A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis* 18: 533–537.
- bib0010 [2] Ballif BA, Villen J, Beausoleil SA, *et al.* (2004) Phosphoproteomic analysis of the developing mouse brain. *Molecular and Cellular Proteomics* 3: 1093–1101.
- bib0015 [3] Bendixen E (2005) The use of proteomics in meat science. *Meat Science* 71: 138–149.
- bib0020 [4] Biressi S and Rando T (2010) Heterogeneity in the muscle satellite cell population. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 21(8): 845–854.
- bib0025 [5] Bischoff R (1986) A satellite cell mitogen from crushed adult muscle. *Developmental Biology* 115: 140–147.
- bib0030 [6] Bonnet M, Cassar-Malek I, Chilliard Y, and Picard B (2010) Ontogenesis of muscle and adipose tissues and their interactions in ruminants and other species. *Animal* 4: 1093–1109.
- bib0035 [7] Bouley J (2004) Analyse protéomique du muscle squelettique bovin, Thèse (Dr. d'Université) option. Biochimie Thesis, Université de Clermont-Ferrand 2.
- bib0040 [8] Bouley J, Chambon C, and Picard B (2004) Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 4: 1811–1824.
- bib0045 [9] Bouley J, Meunier B, Chambon C, *et al.* (2005) Proteomic analysis of bovine skeletal muscle hypertrophy. *Proteomics* 5: 490–500.
- bib0050 [10] Chan XCY, McDermott JC, and Siu KWM (2007) Identification of secreted proteins during skeletal muscle development. *Journal of Proteome Research* 6: 698–710.
- bib0055 [11] Charge SBP and Rudnicki MA (2004) Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiological Reviews* 84: 209–238.
- bib0060 [12] Chaze T, Bouley J, Chambon C, *et al.* (2006) Mapping of alkaline proteins in bovine skeletal muscle. *Proteomics* 6: 2571–2575.
- AU11 bib0065 [13] Chaze T, Hocquette JF, Meunier B, *et al.* (2009) Recherche de marqueurs de tendreté de la viande de jeunes bovins de races à viande par analyse protéomique. In: *Rencontres Recherches Ruminants*, Paris, vol. 16, pp. 151–154.
- bib0070 [14] Chaze T, Meunier B, Chambon C, *et al.* (2008) *In vivo* proteome dynamics during early bovine myogenesis. *Proteomics* 8: 4236–4248.
- bib0075 [15] Chaze T, Meunier B, Chambon C, *et al.* (2009) Proteome dynamics during contractile and metabolic differentiation of bovine foetal muscle. *Animal* 3: 980–1000.
- bib0080 [16] Chaze T, Meunier B, and Picard B (2008) Description of *in vivo* bovine myogenesis using proteomic approach gives new insights for muscle development. *Archives of Animal Breeding* 51: 51–57.
- bib0085 [17] Chelh I, Meunier B, Picard B, *et al.* (2009) Molecular profiles of quadriceps muscle in myostatin-null mice reveal PI3K and apoptotic pathways as myostatin targets. *BMC Genomics* 10: 196.
- AU12 bib0090 [18] Chelh I, Picard B, Hocquette JF, and Cassar-Malek I (2010) Myostatin inactivation induces a similar muscle molecular signature in double-musced cattle as in mice. *Animal* (in press).
- bib0095 [19] Furge LL, Chen K, and Cohen S (1999) Annexin VII and annexin XI are tyrosine phosphorylated in peroxovanadate-treated dogs and in platelet-derived growth factor-treated rat vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* 274: 33504–33509.
- bib0100 [20] Georgiadis V, Stewart HJS, Pollard HJ, *et al.* (2007) Lack of galectin-1 results in defects in myoblast fusion and muscle regeneration. *Developmental Dynamics* 236: 1014–1024.
- bib0105 [21] Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, *et al.* (2000) Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 9390–9395.
- bib0110 [22] Hamelin M, Sayd T, Chambon C, *et al.* (2006) Proteomic analysis of ovine muscle hypertrophy. *Journal of Animal Science* 84: 3266–3276.
- bib0115 [23] Haugk KL, Roeder RA, Garber MJ, and Quinn LS (1996) Crushed muscle extracts: A model system to investigate growth factor regulation of satellite cell activities in meat animals. *Basic and Applied Myology* 6: 163–173.
- bib0120 [24] Herrera-Mendez CH, Becilla S, Boudjellal A, and Quali A (2006) Meat ageing: Reconsideration of the current concept. *Trends in Food Science and Technology* 17: 394–405.
- bib0125 [25] Hocquette JF, Bernard C, Cassar-Malek I, *et al.* (2007) Mise en évidence de marqueurs de tendreté de la viande bovine par des approches de génomique fonctionnelle (projet MUGENE). In: *3R*, Paris.
- bib0130 [26] Hollung K, Veiseth E, Jia X, *et al.* (2007) Application of proteomics to understand the molecular mechanisms behind meat quality. *Meat Science* 77: 97–104.
- bib0135 [27] Huang DW, Sherman BT, and Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols* 4: 44–57.
- bib0140 [28] Jia X, Hollung K, Therkildsen M, *et al.* (2006) Proteome analysis of early post-mortem changes in two bovine muscle types: *M. longissimus dorsi* and *M. semitendinosus*. *Proteomics* 6: 936–944.
- bib0145 [29] Kislinger T, Gramolini AO, Pan Y, *et al.* (2005) Proteome dynamics during C₂C₁₂ myoblast differentiation. *Molecular and Cellular Proteomics* 4: 887–901.
- bib0150 [30] Lametsch R, Karlsson A, Rosenvold K, *et al.* (2003) Postmortem proteome changes of porcine muscle related to tenderness. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 6992–6997.
- bib0155 [31] Lennon NJ, Kho A, Bacskai BJ, *et al.* (2003) Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. *Journal of Biological Chemistry* 278: 50466–50473.
- bib0160 [32] Li M, Cai D, Wang Y, *et al.* (2000) Two novel myogenic factors identified and isolated by sequential isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* 21: 289–292.
- bib0165 [33] Ma'ayan A (2008) Network integration and graph analysis in mammalian molecular systems biology. *IET Systems Biology* 2: 206–221.
- bib0170 [34] Morzel M, Terliouw C, Chambon C, *et al.* (2008) Muscle proteome and meat eating qualities of *Longissimus thoracis* of "Blonde d'Aquitaine" young bulls: A central role of HSP27 isoforms. *Meat Science* 78: 297–304.

- [bib0175](#) [35] Picard B, Barboiron C, Minissian L, *et al.* (2008) Analyse protéomique appliquée à l'identification de la composition en protéines d'une préparation de muscle "crushed-muscle". In: *Viandes et produits carnés, 12èmes Journées Sciences du Muscle et Technologies des Viandes*, pp. 187–188. Tours: Hors-série.
- [bib0180](#) [36] Picard B, Berri C, Lefaucheur L, *et al.* (2010) Skeletal muscle proteomics in livestock production. *Briefings in Functional Genomics* 9: 259–278.
- [bib0185](#) [37] Picard B, Bouley J, Cassar-Malek I, *et al.* (2005) Proteomics applied to the analysis of bovine muscle hypertrophy. In: Hocquette JF and Gigli S (eds.) *Indicators of Milk and Beef Quality*, pp. 379–384. Wageningen: Wageningen Academic Publishers.
- [bib0190](#) [38] Picard B, Lefaucheur L, Berri C, and Duclos MJ (2002) Muscle fibre ontogenesis in farm animal species. *Reproduction Nutrition Development* 42: 415–431.
- [bib0195](#) [39] Puente LG, Voisin S, Lee REC, and Megeney LA (2006) Reconstructing the regulatory kinase pathways of myogenesis from phosphopeptide data. *Molecular and Cellular Proteomics* 5: 2244–2251.
- [bib0200](#) [40] Reintsch WE and Mandato CA (2008) Deciphering animal development through proteomics: Requirements and prospects. *Proteome Science* 6: 21.
- [bib0205](#) [41] Sawdy JC, Kaiser SA, St-Pierre NR, and Wick, MP (2004) Myofibrillar 1-D fingerprints and myosin heavy chain MS analyses of beef loin at 36 h postmortem correlate with tenderness at 7 days. *Meat Science* 67: 421–426.
- [bib0210](#) [42] Shibata M, Matsumoto K, Oe M, *et al.* (2009) Differential expression of the skeletal muscle proteome in grazed cattle. *Journal of Animal Science* 87: 2700–2708.
- [bib0215](#) [43] Taga H, Bonnet M, Meunier B, *et al.* (2009) Proteome dynamics during adipogenesis in perirenal adipose tissue from Blonde d'Aquitaine and Charolais fetuses. In: *Novel Insights in Adipose Cell Functions, Colloque international de Médecine et Recherche de la fondation IPSSEN*, Paris, France, p. 41.
- [bib0220](#) [44] Tannu NS, Rao VK, Chaudhary RM, *et al.* (2004) Comparative proteomes of the proliferating C₂C₁₂ myoblasts and fully differentiated myotubes reveal the complexity of the skeletal muscle differentiation program. *Molecular and Cellular Proteomics* 3: 1065–1082.
- [bib0225](#) [45] Unlu M, Morgan ME, and Minden JS (1997) Difference gel electrophoresis: A single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18: 2071–2077.
- [bib0230](#) [46] Wallace GQ and McNally EM (2009) Mechanisms of muscle degeneration, regeneration, and repair in the muscular dystrophies. *Annual Review of Physiology* 71: 37–57.
- [bib0235](#) [47] Wilkins MR, Gasteiger E, Sanchez JC, *et al.* (1998) Two-dimensional gel electrophoresis for proteome projects: The effects of protein hydrophobicity and copy number. *Electrophoresis* 19: 1501–1505.
- [bib0240](#) [48] Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, *et al.* (1996) Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 13: 19–50.
- [bib0245](#) [49] Yanagida M (2002) Functional proteomics; current achievements. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 771: 89–106.
- [bib0250](#) [50] Zhai B, Villen J, Beausoleil SA, *et al.* (2008) Phosphoproteome analysis of *Drosophila melanogaster* embryos. *Journal of Proteome Research* 7: 1675–1682.

DOT BLOT Protéines

Ce mode opératoire décrit la mise en évidence d'une protéine avec un anticorps spécifique par Dot Blot, de la préparation de la manip à la quantification des spots.

Principe :

Les protéines sont fixées directement sur la membrane, ce qui évite les étapes de migration + transfert du Western Blot. Les hybridations se font selon le même principe que les Western Blot. L'émission de fluorescence par un anticorps secondaire est utilisée pour détecter et quantifier la protéine recherchée.

Matériel :

- Membranes nitrocellulose Bio-Rad Trans-Blot Transfer Medium Pure nitrocellulose Membrane 0,45µm 162-0115
- Appareillage de dépôt Schleicher&Schuell Minifold I Dot-Blot
- Papier Wathman 3MM Chr
- Tubes à hybridation Labnet GL45
- Four à hybridation AQ/621
- Scanner à fluorescence Odyssey LICOR (Block 1, Etage 4)

Solutions :

- Préparation du T-TBS 10X pour pH 8.0 (source fiche ECL)

Produits	PM	[conc]	Quantité
Tris-HCl (Sigma T-5941)	157.6	113 mM	17.76 g
Tris base (Sigma T-6066)	121.1	87.5 mM	10.60 g
NaCl (Sigma S9625)	58.44	1.37 M	80.06 g
Tween 20 (Merck 8221840500)		0.5 %	5 ml
H2O distillée QSP			1 L

Ajuster le pH avant d'ajuster et conserver à température ambiante

- **T-TBS 1X** : 100 ml T-TBS 10X + 900 ml H2O

- **Solution de T-TBS 1X + Lait écrémé 10%** : 50 ml T-TBS 1X + 5g de lait

- **Solution de T-TBS 1X + Lait écrémé 1%** : 50 ml T-TBS 1X + 0,5g de lait

- **Anticorps secondaire LICOR IRDye 800CW (1 mg / ml).** A CONSERVER A L'ABRI DE LA LUMIERE.

Rédigée par : Nom : Guillemin Nicolas Visa : Date d'effet :	Revue par : Nom : Visa : Date d'effet :	Approuvée par : Nom : Visa :

- Préparation du PBS 5X (source annexe immunohistologie)

Produits	PM	[conc]	Quantité
NaCl (Sigma S9625)	58.44	690 mM	40.32 g
KCl (Prolabo 26.764.298)	74.55	10 mM	0.7456 g
Na ₂ HPO ₄ (Sigma S7907)	141.96	45 mM	6.39 g
KH ₂ PO ₄ (Prolabo 26 926 298)	136.09	5 mM	0.68 g
H ₂ O distillée QSP			1 L

- PBS 1X : 200 ml PBS 5X + 800 ml H₂O

- PBS 1X + 0,1% Tween20 : 1 L PBS 1X + 1 mL Tween 20

A mélanger sous agitation

- Solution de PBS 1X + 0,1% Tween20 + Lait écrémé 1% : 50 ml PBS 1X + 0,1% Tween20 + 0,5g de lait

- Solution de PBS 1X + 0,1% Tween20 + Lait écrémé 1% + Anticorps LICOR 1/20000 : 20 ml PBS 1X + 0,1% Tween20 + 0,2 g de lait + 1 µl Anticorps LICOR. A CONSERVER A L'ABRI DE LA LUMIERE (1 SEMAINE OU 7 UTILISATIONS MAXIMUM).

- Tampon d'extraction des échantillons (Tampon 2D urée, thiourée, CHAPS), prévoir 50 mL par manip de Dot-Blot pour servir de blanc de normalisation.

Préparation de la manip (utilisation du fichier Excel « AnalyseDB »)

Mise en place des différentes expérimentations Dot

Une manip standard de Dot-Blot permet de quantifier 40 échantillons en quadruplicats répartis sur deux membranes identiques, pour une protéine. Ainsi, lorsque le nombre d'échantillon à analyser dépasse 40, il est nécessaire de répartir les échantillons sur plusieurs manips. Cette répartition se fait de la façon suivante :

- ❖ Disposer les échantillons sur les manips de manière équitable, les différentes manips de Dot-Blot doivent analyser un nombre d'échantillon le plus égal possible.
- ❖ Réduire le nombre de manips de Dot-Blot autant que possible.
- ❖ Ne pas analyser des échantillons d'un même groupe biologique sur une seule manip. Il faut réaliser un assortiment des différents groupes biologiques sur une manip.
- ❖ Le nom des échantillons et leur concentration doivent être indiqués sur la feuille « DB-JX », répartis sur les différentes manips de Dot-Blot nécessaires (J1, J2, J3, J4, J5) selon les critères exposés ci-dessus.

Mise en place du mix de normalisation

Le mix est constitué de 40 échantillons différents. Ces échantillons doivent être variés, afin que le mix soit représentatif de l'ensemble des échantillons analysés. C'est à l'utilisateur d'indiquer sur la feuille « Mix » les échantillons constituant ce mix, ainsi que leur concentration. Afin de produire 2 mL de ce mix, l'utilisateur doit assembler 50 µl de chacun des 40 échantillons, pour obtenir un mix dont la concentration est calculée en fonction de la concentration des échantillons. De même, les volumes des trois dépôts du mix (7.5, 15, 22.5) sont automatiquement calculés. Le blanc, correspondant au 0, est le tampon d'extraction des échantillons.

Mise en place des plans de dépôt

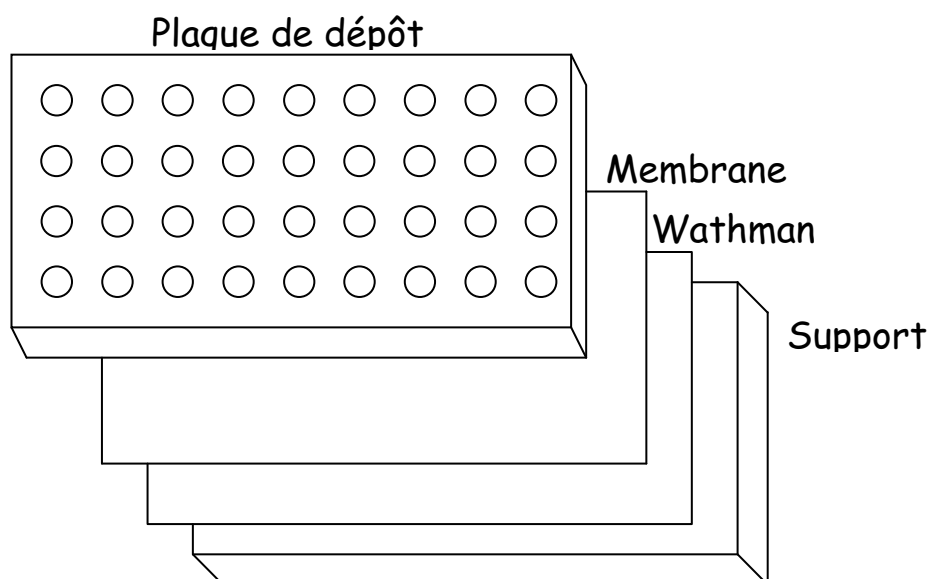
A partir de ce que l'utilisateur a indiqué sur la feuille « DB-JX », les plans de dépôt des manips J1, J2, J3, J4 et J5 sont automatiquement réalisés sur les feuilles « J1 », « J2 », « J3 », « J4 », et « J5 » respectivement. Ces plans de dépôts sont organisés de façon symétrique sur les différentes manips, de telle façon que les réplicats soient déposés de manière aléatoire. Chaque manip en JX comporte deux membranes identiques.

Mise en place des matrices d'analyse GenePix

De même, les matrices pour GenePix sont automatiquement réalisées sur les feuilles « MatriceJ1 », « MatriceJ2 », « MatriceJ3 », « MatriceJ4 », et « MatriceJ5 ». L'utilisateur doit cependant effectuer une transformation du fichier Excel (extension .xls) en fichier GenePixArrayListFile (extension .gal). Pour cela, il faut copier la feuille de matrice, par exemple « MatriceJ1 », et la copier dans un nouveau classeur. Ensuite, il faut supprimer les feuilles du classeur autre que « MatriceJ1 ». Puis, en utilisant la commande Fichier -> Enregistrer sous, enregistrer le classeur, en gardant le nom de « MatriceJ1 », en sélectionnant le type de fichier « Texte (séparateur : tabulation) » dans un emplacement choisi. Ensuite, il faut changer manuellement l'extension du fichier, c'est-à-dire remplacer le .txt du fichier « MatriceJ1.txt » en .gal, pour obtenir le fichier « MatriceJ1.gal ». La matrice est alors prête à être utilisée par GenePix.

Mode opératoire :

-  Décongeler les échantillons durant la préparation de la manip, pour les vortexer après une complète décongélation.
-  Découper deux membranes en nitrocellulose de dimension 7.5 cm X 11.5 cm (96 puits).
-  Découper deux feuilles de Wathman de même dimension que les membranes.
-  Mettre le support en place, placer ensuite une feuille de Wathman, puis une membrane par-dessus. Enfin, poser la plaque de dépôt et clamper celle-ci sur le support à l'aide des attaches métalliques. Mettre la seconde membrane et la seconde feuille de Wathman de côté.



- ✚ Connecter le tuyau d'aspiration et mettre en route la pompe à vide (aspiration maximale).
- ✚ En utilisant la méthode de pipetage inverse, effectuer les dépôts indiqués par le plan de dépôt. Utiliser le même cône pour les dépôts d'un individu. Faire attention à ne pas heurter la membrane avec le cône de la pipette, la goutte se dépose par capillarité.
- ✚ Laisser sécher les dépôts pendant 4 minutes, puis démonter l'appareil en douceur. Si la membrane adhère légèrement au Wathman, il faut la décoller avec précaution en se servant d'une pince. Le papier Wathman a pris une forme arrondie à l'endroit où un dépôt a été effectué, ce qui permet de contrôler une première fois si un échantillon n'a pas été oublié.
- ✚ Immerger la membrane dans du T-TBS 1X. Au moment où la membrane est en contact avec la solution de T-TBS, les dépôts se colorent en blanc. Cela permet de vérifier si les puits n'ont pas bavé et forment des spots quantifiables. Après quelques minutes, la couleur blanche disparaît.
- ✚ Réaliser la seconde membrane, comme la première. Cette dernière doit rester dans le T-TBS 1X.
- ✚ Placer les membranes dans un tube à hybridation. Mettre du tampon T-TBS 1X afin de « noyer » une membrane dans le tube maintenu à la verticale, afin d'éliminer les bulles d'air qui se sont formées entre la membrane et le verre. Répéter pour la seconde membrane. Saturer les membranes 20 minutes dans le four à hybridation préchauffé à 37°C avec 20 ml de la solution de T-TBS 1X + lait 10%.
- ✚ Effectuer un rinçage rapide avec du T-TBS 1X.
- ✚ Préparer la solution d'anticorps primaire dans du T-TBS 1X + 1% lait. 15ml sont nécessaires pour un tube d'hybridation, indépendamment du nombre de membranes qu'il contient.
- ✚ Effectuer l'hybridation à 37°C dans le four à hybridation pendant 1 heure 30.
- ✚ Effectuer 4 lavages avec du PBS 1X + 0,1% Tween20 de 4 minutes chacun, dans le four à hybridation à 37°C.
- ✚ Hybrider l'anticorps secondaire LI-COR dans le four à hybridation à 37°C entre 30 et 60 minutes (60 étant le maximum à ne pas dépasser) dans le noir. A partir de cette étape, il faut garder les membranes au maximum dans l'obscurité. La solution d'anticorps peut être récupérée pour plusieurs utilisations ultérieures. En condition de quantification, il est conseillé de ne pas dépasser 3 utilisations, ni de reprendre une solution de plus de 3 jours.
- ✚ Effectuer 4 lavages avec du PBS 1X + 0,1% Tween20 de 4 minutes chacun.
- ✚ Effectuer 1 lavage avec du PBS 1X de 5 minutes.

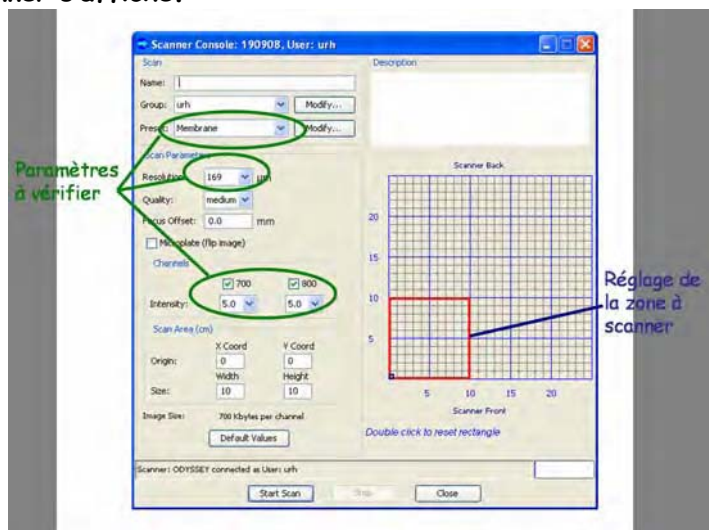
- Sortir les membranes du tube et les placer dans du PBS 1X, dans une boîte recouverte d'aluminium. Les membranes sont prêtes à être scannées, après avoir paramétré le scanner.

Acquisition de l'image (PC du scanner Odyssey LICOR):

- Ouvrir la session URH, mot de passe « Chaze ». Démarrer le logiciel Odyssey.



- Créer un répertoire de sauvegarde, puis créer un nouveau projet. Préciser au logiciel l'utilisateur URH, mot de passe Chaze. Cliquer ensuite sur Scan. La console du scanner s'affiche.



- Mettre le nom du scanner en cours, vérifier que les paramètres standards sont bien précisés (Preset : Membrane / Resolution : 169µm / 700 et 800 nm cochés / Intensity = 5). Rentrer les coordonnées de la zone à scanner (une graduation est présente sur le scanner). Le temps de l'opération dépend de la taille de la zone à scanner (pour une membrane de 96 puits, environ 5 minutes).
- Laver la vitre du scanner avec un peu d'eau, sécher. Poser les membranes bien à plat en utilisant le rouleau pour enlever les bulles d'air.
- Cliquer sur « Start Scan ». Le temps de scanner est indiqué en bas de la fenêtre de contrôle. Au fur-et-à-mesure du scanner, un aperçu s'affiche, ce qui permet d'arrêter immédiatement le scan en cas de problèmes.
- Une fois le scanner terminé, donner un nom à l'image obtenue.

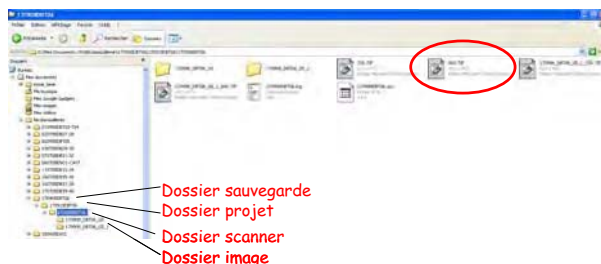
Dossier projet

Dossier scanner

Image



- Le scanner est terminé, pour quitter le logiciel Odyssey il suffit de cliquer sur la croix en haut à droite et de cliquer sur « Oui » lorsque le logiciel demande de sauvegarder le projet – autrement les images scannées ne seront pas enregistrées.



- Pour résumer, il y a le dossier de sauvegarde, contenant le dossier du projet, contenant lui-même le dossier du scanner effectué. Le fichier utilisé pour la quantification est le fichier 800.TIF, qui se trouve dans le dossier du scanner effectué. Il faut copier tout le dossier du projet sur une clé pour pouvoir travailler sur les quantifications.

- Après scanner, les membranes peuvent être conservées dans du PBS 1X à 4°C dans l'obscurité et être scannées des mois après.

Analyse des résultats (PC Anadim, logiciel GenePix, fichier Excel « AnalyseDB »):

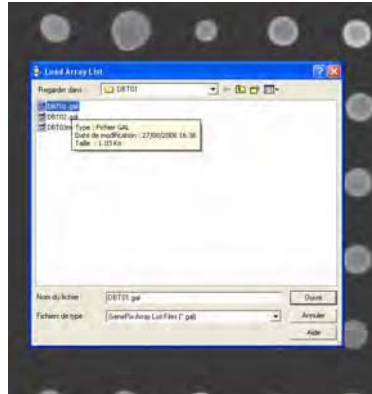
- Ouvrir GenePix. Puis charger l'image à analyser (CTRL + O), le fichier 800.TIF, qui correspond au signal de 800nm émis par le fluorochrome.



- Préciser au logiciel la longueur d'onde utilisée, soit 800nm. Puis afficher les niveaux de gris.



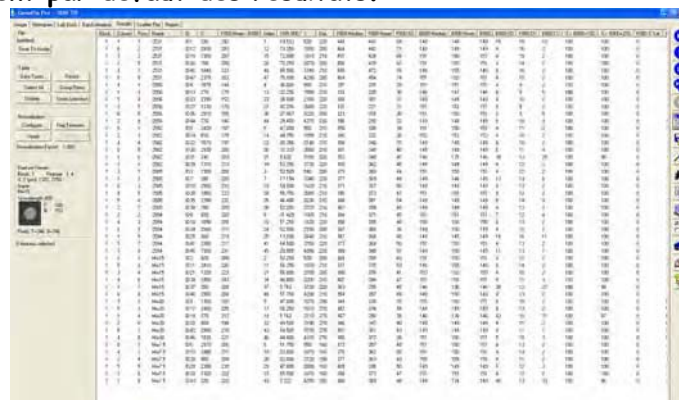
- Charger la matrice correspondant au dot blot (ALT + Y). Il s'agit du fichier .gal créé précédemment pour chaque manip de Dot-Blot (MatriceJ1.gal, MatriceJ2.gal, etc...).



- Caler la matrice sur les spot puis mettre le contour adaptatif (MAJ + F5). Au besoin, redéfinir un spot avec la souris (passage en mode sélection de spot en appuyant sur la touche F, puis cliquer sur le spot à modifier, le déplacer si besoin est). Pour réduire la taille du spot manuellement, il faut appuyer sur CTRL + Flèche Gauche. Pour l'augmenter, CTRL + Flèche Droite. Réadapter le contour (ALT + F5). Vérifier qu'il n'y ait pas de biais avec le bruit de fond.



- Spécifiquement pour le blanc, comme le signal est quasi-inexistant, pour chacun des spots il faut les flaguer en Good en appuyant sur la touche O. Puis il faut les redimensionner pour qu'ils aient la même taille qu'un spot d'échantillon. De même, si un spot est flagué en Bad (un spot barré en croix), il faut le flaguer en Good.
- Prendre une capture d'écran du Dot avec sa matrice d'analyse, pour la coller sur la feuille « Données J1 ». Effectuer l'analyse (Alt + A). Il est très important de ne pas changer le classement des résultats par défaut de GenePix, c'est-à-dire par nom de spot. En effet, les feuilles de calcul ont été réalisées en se basant sur ce classement par défaut des résultats.



- Cliquer sur « Select All » dans la fenêtre « Table » sur la gauche pour sélectionner l'ensemble des résultats, puis sur Ctrl + C pour les copier. Il faut coller les résultats bruts de GenePix obtenus sur la membrane I de la manip J1 sur

la case A1 de la feuille « BrutJ1-I », de la membrane II de J1 sur la case A1 de la feuille « BrutJ1-II », etc...

Equation de normalisation

A ce stade, les données collectées ne sont que des intensités de fluorescence de spot. Il est nécessaire, en premier lieu, d'enlever le bruit de fond de la membrane sur chaque spot, puis dans un second temps de normaliser ces spots, c'est-à-dire de transformer par une fonction mathématique $y = ax + b$, l'intensité brute de fluorescence (x) en quantité arbitraire de protéine (y). Tous ces calculs sont effectués automatiquement dans la feuille « DonnéesJ1 » pour J1, etc... Les deux membranes d'une manip sont calculées côte à côte.

➤ Correction du bruit de fond

Les données pour calculer le bruit de fond sont :

- ❖ **B800** : correspond à l'intensité de fluorescence médiane d'un pixel de la zone entourant le spot, définie par un halo blanc autour de ce dernier par GenePix. Cette zone est admise comme étant représentative du bruit de fond du spot (qui est lui-même totalement caché par la fluorescence de l'anticorps secondaire). La valeur de B800, puisque c'est une médiane, n'est pas affectée par la présence de pixel sur-intense ou à une déformation légère de la membrane.
- ❖ **F800 Total Intensity** : correspond à l'intensité totale du spot délimité par GenePix. Le logiciel calcule la somme des intensités de chaque pixel constituant ce spot. En raison de ce calcul, la valeur de F800 Total Intensity est très sensible à la présence de pixel sur-intense ou à une déformation de la membrane. En revanche, une hétérogénéité des spots n'a pas de conséquences.
- ❖ **F Pixels** : correspond à la taille en pixel du spot défini par GenePix.

Pour chaque spot, les calculs à effectuer sont :

- ❖ **BdF** : le bruit de fond propre au spot est calculé en rapportant le bruit de fond médian à la taille du spot en pixel. $BdF = B800 \times F \text{ Pixels}$
- ❖ **SpotB** : l'intensité brute du spot corrigée du bruit de fond. $SpotB = F800 \text{ Total Intensity} - BdF$

Les données des spots sont à ce stade corrigées du bruit de fond.

➤ Calcul de l'équation de normalisation

Le mix, servant de normalisateur, est utilisé pour calculer une droite étalon, ou droite de normalisation. Pour cela, la moyenne des 4 valeurs SpotB pour chaque point du mix (0, 7.5, 15 et 22.5) est calculée, pour donner MoySpotB pour chaque point. A chaque valeur de MoySpotB correspond une valeur MoySpotN, qui est la valeur arbitraire de chaque spot constituant le mix. Ainsi, MoySpotN est égal à 0 pour le blanc, 7.5 pour le mix à 7.5, 15 pour le mix à 15, et 22.5 pour le mix à 22.5. Une droite $MoySpotN = f(MoySpotB)$ est alors tracée. L'équation de cette droite constitue l'équation de normalisation. Le coefficient directeur a et la constante de l'équation b sont calculés à part dans deux cellules différentes afin de pouvoir être utilisés par la suite. A ce stade, il est très important de vérifier la valeur du R^2 de l'équation, qui ne doit pas descendre en dessous de 0.97.

Normalisation des spots des échantillons

L'équation de droite ainsi obtenue permet de normaliser les intensités brutes de chaque échantillon en intensité normalisée (par rapport au mix de référence). L'équation est $SpotN = a \times SpotB + b$. SpotN est la valeur du spot normalisée qui sera utilisée dans la suite des calculs.

Intervention : Une fois les valeurs SpotN obtenues, il est important de contrôler les valeurs des spots constituant le mix (4 par point du mix). En effet, si ces derniers présentent des valeurs de SpotN écartées de leur valeur théorique, ces spots sont déviants et faussent le calcul de l'équation de normalisation. Le tableau « SpotN du mix en détail » permet de visualiser facilement les valeurs SpotN de chaque point du mix. Il est également possible d'identifier à l'analyse de l'image du Dot-Blot des spots du mix aberrants. Ces spots aberrants doivent donc être retirés du calcul, à l'exception du blanc, qui présente naturellement une grande variabilité. En valeur de SpotN, un point est déviant lorsqu'il dépasse de +/- 1 la valeur de 7.5 et 15, et +/- 1.5 pour 22.5. Le point du mix à 7.5 est généralement le plus variable, en raison de l'erreur au pipetage sur un petit volume. Il faut ensuite recalculer la moyenne d'un point du mix MoySpotB, en appliquant la formule de moyenne aux spots considérés. Le R^2 de l'équation doit s'améliorer.

✚ Faire la quantification de la même manière pour la deuxième membrane.

✚ Filtration des spots aberrants / Calcul de la moyenne des échantillons

Ces calculs sont effectués dans la dernière feuille de calcul, « MoyJ1 » pour J1, etc... La feuille permet de rappeler, pour chaque échantillon, les spots des deux membranes qui le constituent, ainsi que leur valeur SpotN (SpotN - I pour la membrane I, SpotN - II pour la membrane II).

➤ Calculs des CVs pour chacun des échantillons.

- ❖ Un CV Inter I-II est calculé entre les deux mêmes spots des deux membranes I et II. Il y en a donc 2 par échantillon. La moyenne de tous ces CV Inter I - II constitue le CV inter(t).
- ❖ Un CV Intra I est calculé entre les deux spots de la membrane I. Le CV Intra II est calculé de la même façon pour la membrane II. Il y en a donc deux par échantillons. La moyenne de tous ces CV Intra I et II constitue le CV intra(t).

➤ Filtration des spots aberrants.

A ce stade, chaque échantillon est constitué de 4 valeurs de SpotN. Dans le cas de la manip parfaite, ces 4 valeurs seraient identiques. Dans la pratique, ces spots présentent des variations qui n'altèrent pas de manière significative le calcul de la moyenne de l'échantillon. Mais il arrive cependant qu'un spot ou deux soient aberrants. Souvent, il s'agit d'un problème technique, comme une poussière dans le spot, une forme difficile à quantifier pour ce dernier... Afin d'éliminer ces spots aberrants du calcul de la moyenne, une filtration des données est nécessaire. Cette filtration consiste à éliminer les spots dont la valeur SpotN diffère de +/- 30% de la valeur de la médiane des spots de l'échantillons, MedianeN. Cette méthode est très similaire à la MAD, Median Absolute Difference, utilisée sur les puces à ADN.

Pour effectuer cette filtration, un calcul de la médiane MedianeN des 4 spots est effectué. Un CV, CVN, est calculé pour chaque échantillon. La moyenne de tous ces CVN constitue le CV N(t). Ensuite, pour chaque spot, l'écart entre sa valeur SpotN et MedianeN est calculée en valeur absolue, et ramenée en %. Une formule permet de faire en sorte que si un spot présente un écart à la médiane supérieur à 30 %, sa valeur SpotN n'est pas copiée dans la partie du tableau servant au calcul des moyennes des échantillons. Dans le cas contraire, les spots sont des SpotNF (Normalisés Filtrés) et seront utilisés dans le calcul de la moyenne de l'échantillon.

Intervention : Il peut arriver que pour un problème technique, comme par exemple un oubli de dépôt, un sur-dépôt, ou une fuite de spot, deux spots d'un échantillon soient aberrants (cet état aberrant résultant d'une analyse de l'image du Dot-Blot, non de l'étape de filtration). Il est dans ce cas nécessaire de recalculer la médiane sur les 2 spots n'ayant pas eu de problèmes techniques, sinon la médiane serait faussée et ne filtrerait pas les bons spots. Dans ce cas, il est aussi utile de retirer les CVs concernés par ces spots aberrants. Pour cette raison, l'analyse de l'image du Dot-Blot, spot par spot, est toujours indispensable pour filtrer les données avec pertinence.

🌈 Calcul de la moyenne des échantillons

Pour chaque échantillon, cette moyenne, MoyNF (Moyenne Normalisée Filtrée), se fait à partir des valeurs SpotNF résultantes de l'étape de filtration. Le nombre de spots conservés par l'étape de filtration et pris en compte pour le calcul de la moyenne est indiqué, afin de pouvoir calculer le %SpotU. Un CVNF (Normalisé Filtré) est calculé à partir des valeurs SpotNF de chaque échantillon. La moyenne de tous les CVNF constitue le CVNF(t).

Les moyennes de chaque échantillon sont calculées et prêtes à être analysées.

🌈 Analyse qualitative de la quantification de la protéine sur l'ensemble des échantillons

Différentes données calculées précédemment permettent d'analyser la qualité de la quantification effectuée.

➤ Les droites de normalisation

Les droites des deux membranes, I et II, doivent être très proches, puisqu'elles résultent de la même manip. Cela permet d'analyser si les modifications apportées au calcul des droites de normalisation a eu un effet négatif. Il peut arriver que les deux équations présentent quelques différences. Cela traduit un effet manip entre les deux membranes. La normalisation des données permet de corriger cet effet pour le calcul de la moyenne des échantillons.

➤ Les CV inter(t) et intra(t)

❖ CV inter(t)

C'est le pourcentage de variabilité entre deux réplicats d'un échantillon situés sur le même spot de deux membranes différentes.

❖ CV intra(t)

C'est le pourcentage de variabilité entre deux réplicats d'un échantillon situés sur deux spots différents de la même membrane.

Des CV inter et intra proches indiquent qu'il n'y pas eu de problème technique sur l'ensemble de la manip. Un CV inter plus élevé que l'intra indique un effet entre les deux membranes I et II.

➤ Les CV N(t) et CVNF(t)

❖ CV N(t)

C'est le pourcentage de variabilité entre les 4 spots d'un échantillon, après normalisation et avant la filtration des données.

❖ CVNF(t)

C'est le pourcentage de variabilité entre les différents réplicats d'un échantillon, après normalisation et filtration des données.

S'il y a eu filtration de données, le CVNF(t) doit être inférieur au CV N(t). Cependant, cette différence est minime, car il n'y a que quelques spots qui sont filtrés sur l'ensemble de la manip. Cette comparaison permet d'analyser la pertinence de la filtration.

➤ %SpotU

C'est le pourcentage de spots pris en compte dans le calcul de la moyenne d'un échantillon, après normalisation et filtration des spots aberrants. Il permet d'analyser l'importance des données aberrantes, et donc la validité des moyennes des échantillons. En général, une manip présente un %SpotU supérieur à 95%.

➤ CVTot

Ce CVTot correspond à l'erreur relative (en %) de la mesure pour chaque échantillon (= exactitude). Il est calculé par comparaison entre le résultat obtenu (la moyenne de l'ensemble des MoyNF des échantillons constituant le mix de normalisation) avec la valeur vraie, théorique, à obtenir (la quantité de protéines du mix fixée arbitrairement à 15 unité de protéines, c'est-à-dire MoySpotN du point 15). Ce calcul s'effectue pour chaque protéine analysée, une fois que l'ensemble des échantillons constituant le mix a été quantifié. Il n'est pas automatisé car il dépend des échantillons constituant le mix, à l'appréciation de l'expérimentateur (et donc non prévisible) et effectué par ce dernier.

Ce CVTot prend en considération l'ensemble des variations de la manip et des corrections qui y sont apportées, c'est-à-dire les dépôts, l'ensemble des réactions moléculaires, la normalisation, la filtration et le calcul de la moyenne MoyNF. Le CVTot dépend de l'anticorps utilisé, certains montrant un CVTot faible (moins de 1%), d'autres plus élevé (plus de 10%).

La moyenne MoyNF de chaque échantillon est donc comprise dans un intervalle défini par ce CVTot, qui permet donc d'apprécier la pertinence des résultats obtenus.

ANALYSE APPROFONDIE DE MARQUEURS DE LA TENDRETÉ DE LA VIANDE BOVINE, ÉTUDE DE FONCTIONNALITÉ DES GÈNES ET ANALYSES DES POLYMORPHISMES

GUILLEMIN Nicolas - *Equipe C2M (PHASE) / UGMA (Génétique)*

Responsables : Brigitte PICARD (C2M - Theix), Hubert Levéziel (UGMA – Limoges)

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

La tendreté de la viande bovine est une qualité sensorielle essentielle pour le consommateur dans un secteur soumis à de fortes pressions (médiatiques, concurrence). Cependant, elle a une origine multifactorielle, ce qui la rend difficilement maîtrisable par la filière viande (Picard *et al.*, 2007).

Dans l'optique d'améliorer la compréhension et la prédiction de la tendreté, une multitude de facteurs ont été identifiés. Leur impact sur la tendreté dépend du système d'élevage, de la race bovine, des individus et du type de muscle. Des tests de prédiction de la tendreté mis au point en Australie et aux USA ne sont pas applicables aux races françaises. Il est donc nécessaire pour la filière, d'une part, de renforcer ses connaissances sur la tendreté de sa viande bovine afin d'améliorer les conditions d'élevage et les lignées de bovins, et d'autre part, de disposer de tests fiables d'estimation de la tendreté.

OBJECTIFS

L'objectif de ma thèse est de valider des marqueurs biologiques de la tendreté identifiés par des approches de génomique fonctionnelle, en particulier dans le cadre du programme MUGENE (projet ANR), ProSafeBeef (projet européen) et des thèses effectuées au sein de l'équipe (Bernard *et al.*, 2007; Bouley *et al.*, 2005). Dans un deuxième temps, des polymorphismes seront recherchés dans les gènes codant les marqueurs les plus pertinents pour la filière bovine française afin d'exploiter cette variabilité pour le développement d'un test génétique.

De plus, les différents marqueurs validés permettront de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la tendreté pour améliorer les systèmes de production de la filière française.

APPROCHE EXPERIMENTALE

Afin d'atteindre cet objectif, j'analyserai les échantillons de deux muscles, le *Longissimus thoracis* (de tendreté supérieure) et le *Semitendinosus* (de tendreté moyenne) sur des taurillons, bœufs et vaches de plusieurs races françaises abattus à l'abattoir expérimental de l'URH de Theix.

Cette approche se fera par des techniques de Western-blot et/ou de RT-PCR, au sein de l'équipe Croissance et Métabolisme du Muscle à Theix, sous la direction de Brigitte Picard. Ensuite, les analyses génétiques se feront dans l'Unité de Génétique Moléculaire Animale à Limoges, sous la direction d'Hubert Levéziel.

RESULTATS ATTENDUS

La validation portera sur une vingtaine de marqueurs, dont la liste sera basée sur les résultats obtenus dans l'équipe par génomique fonctionnelle avec la plateforme de protéomique « Exploration du Métabolisme : des gènes aux nutriments ».

Les premières analyses vont porter sur des protéines de la famille des protéines du choc thermique telles que HSP27, dont l'expression a été corrélée négativement à la tendreté par des études de protéomique et de transcriptomique.

Cette étape de validation permettra de mettre en évidence 5 ou 6 marqueurs biologiques les mieux corrélés à la tendreté dans les différents contextes énoncés auparavant.

Les gènes codant ces marqueurs seront alors analysés afin d'identifier des polymorphismes exploitables dans une approche commerciale, c'est-à-dire que pour un gène, plusieurs polymorphismes doivent être disponibles et répartis dans la population. Toutefois, la difficulté technique de leur détection limitera les possibilités d'exploitation commerciale.

CONCLUSION

Ma thèse s'inscrit dans une optique de recherche finalisée, afin de mettre à la disposition de la filière viande bovine française des outils lui permettant d'être plus compétitive sur le marché sans avoir recours à des méthodes désavouées par les consommateurs (antibiotiques, OGM, hormones).

Certaines protéines sont impliquées à la fois dans des maladies humaines, comme la myopathie de Duchenne ou la Chorée de Huntington, et dans la tendreté de la viande bovine. Des connaissances fondamentales pourraient ainsi être échangées entre ces deux domaines.

REFERENCES

- Bernard, C. *et al.* 2007. New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. *J. Agric. Food Chem.* 55: 5229-5237.
- Bouley, J. *et al.* 2005. Proteomic analysis of bovine skeletal muscle hypertrophy. *Proteomics* 5: 490-500.
- Picard, B. *et al.* 2007. Caractéristiques des muscles et de la viande des principales races bovines allaitantes du massif central. *Sciences des Aliments* 27/2: 168-180.

VALIDATION OF POTENTIAL BEEF TENDERNESS MARKERS AND INTERPRETATION OF THEIR BIOLOGICAL FUNCTIONS

N. Guillemin^{1,2}, H. Levéziel², G. Renand³, J. Lepetit⁴, D. Micol¹, J-F. Hocquette¹, B. Picard¹.

¹ INRA de Theix, Unité de Recherche sur les Herbivores UR1213, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France, ² INRA – Université de Limoges, Unité de Génétique Moléculaire Animale UMR 1061, Faculté des Sciences et Techniques, 87060 Limoges, France, ³ INRA, Station de Génétique Quantitative et Appliquée UR337, 78352 Jouy-en-Josas, France, ⁴ INRA, Station de Recherches sur la Viande UR370, 63122 St-Genès-Champanelle, France.

Introduction

Beef tenderness is a major quality for consumers, which is very variable because it depends on the muscle composition, a mosaic tissue. Some biological markers have been studied by genomic approaches in different situation of countries, breeds, animals and muscle types. At present day, there is no test for the French beef industry to predict the potential tenderness of an animal.

Aim of the study

A list of twenty markers has been established by genomics studies. These markers are studying by proteomic approaches in order to validate the most important for tenderness in the French beef production situation. The final aim is to establish a prediction test for beef tenderness, based on selected markers.

Material and Methods

8 Charolais young bulls, divided in two groups of minor and major tenderness, are compared by Dot Blot analysis, a high rate proteomics approach. This technique has been validated in this study. Specific antibodies for studied markers are used.

Results

Analyses showed that for the 7 markers studied (Hsp20, Hsp27, Hsp70-8, Hsp70-1A/B, MyBP-H, PGM, and Desmin), there are little differences between the two tenderness groups studied.

Discussion

The results show that there is no marker which has a major effect on tenderness, but all the markers have a little effect. The sum of these markers is determinant for tenderness.

Conclusion

The idea to develop a test combining several markers is justified by these results showing that the sum of the markers is more pertinent for tenderness than a single marker.

Acknowledgments

This work is funding by the MUGENE program (GENANIMAL), INRA and the Région Auvergne.

VALIDATION DE MARQUEURS PROTÉIQUES DE LA TENDRETÉ DE LA VIANDE BOVINE : CHOIX MÉTHODOLOGIQUES

GUILLEMIN N., MEUNIER B., LEVEZIEL H.⁽¹⁾, G. RENAND⁽²⁾, J. LEPETIT⁽³⁾,
J-F. HOCQUETTE, PICARD B.

UR 1213 Unité de Recherches sur les Herbivores, INRA Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle

⁽¹⁾ : Unité de Génétique Moléculaire Animale, INRA-Université de Limoges, 87063 Cedex

⁽²⁾ INRA, UR337, 78352 Jouy-en-Josas

⁽³⁾ INRA, UR370, 63122 Sait-Genès-Champanelle

Introduction

La tendreté de la viande bovine est un critère d'appréciation essentiel aux yeux du consommateur. Cette qualité sensorielle, dépendante des nombreuses caractéristiques du muscle, est multifactorielle, et sujette à une grande variabilité. Celle-ci n'est pas maîtrisée par la filière et constitue une source d'insatisfaction pour les consommateurs.

Différentes études ont mis en évidence des marqueurs protéiques de la tendreté par des approches génomiques à haut débit. Ceci a permis de dégager une liste de marqueurs potentiellement impliqués dans la tendreté de la viande.

Afin d'apporter à la filière française des outils de prédiction du potentiel de tendreté, ces marqueurs doivent être validés dans d'autres races à viande françaises, dans différents types de muscles et d'animaux. Pour cela, des analyses quantitatives seront effectuées sur des échantillons de tendreté différente.

L'objectif de cette étude est de déterminer parmi les techniques disponibles (Western Blot et Dot Blot, associé à une révélation chémiluminescente ou fluorescente) laquelle est la plus adaptée pour dégager des différences entre lots d'animaux pour les marqueurs d'intérêt. Les essais sont faits avec l'exemple de la Heat Shock Protein (Hsp) 27 pour laquelle des différences ont été mise en évidence entre lots de tendreté extrême par analyses protéomiques et transcriptomiques (Programme Genanimal MUGENE).

Matériel et Méthode

Echantillons : les échantillons ont été préparés d'après la technique de Bouley *et al* (2004) à partir d'extraction protéiques en tampon d'électrophorèse dénaturant de muscle *Longissimus Thoracis* (LT), prélevés sur des taurillons Charolais. La tendreté de la viande a été évaluée par un jury d'analyse sensorielle et par des analyses mécaniques. Les animaux ont été séparés en deux groupes de 4 de tendreté extrême, faible (T-) et élevée (T+).

Anticorps primaire : la spécificité de l'anticorps anti Hsp27 (Santa Cruz) a été validée au préalable sur muscle bovin par Western Blot.

Western Blot : pour chaque animal, 15 µg de protéines totales ont été déposés en une fois sur un gel SDS-PAGE monodimensionnel de 10 pistes à 12% d'acrylamide. 15 µg de protéines d'un mélange des 8 individus présents en quantité égale sont également déposées comme témoin de normalisation. Le transfert sur membrane PVDF a été réalisé en phase liquide par le TransBlot Biorad, suivi par une phase de saturation par du lait écrémé à 10%. L'anticorps primaire anti-Hsp27 est dilué au 1/8000 et hybridé à 37°C pendant 1 heure. Chaque Western Blot est répété 8 fois afin d'évaluer la variabilité technique.

Dot Blot : pour chaque animal, 15 µg de protéines totales ont été déposées 6 fois (aléatoirement afin d'évaluer la variabilité technique) sur une membrane en nitrocellulose, en utilisant une plaque de dépôt 48 puits (Scleider et Schuell). La membrane a été saturée dans une solution de lait écrémé à 10%. L'anticorps primaire anti-Hsp27 est dilué au 1/3000 et hybridé à 37°C pendant 1 heure.

Révélation chémiluminescente (ECL) : l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase est dilué au 1/20000 (Amersham) et hybridé à 37°C pendant 45 minutes. Le substrat chémiluminescent ECL (PIERCE) est appliqué sur la membrane pendant 1 minute. Une autoradiographie de la membrane est réalisée avec un temps d'exposition de 10 minutes, puis scannée en densité optique sur Expression 10000XL Pro (Epson) (Figure 1).

Révélation fluorescente (FLUO) : l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (LI-COR) est dilué au 1/10000 et hybridé à 37°C pendant 45 minutes. L'émission de fluorescence est détectée dans l'infrarouge par le scanner Odyssey (LI-COR) à 800 nm (Figure 1).

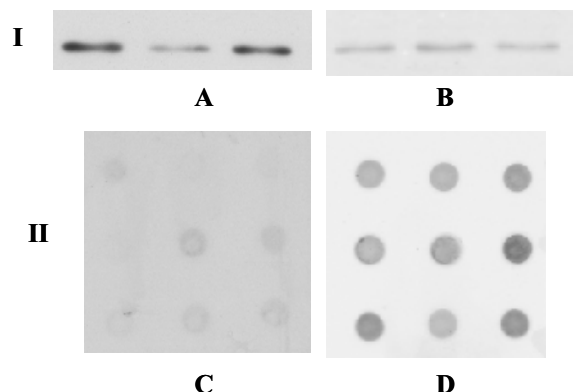
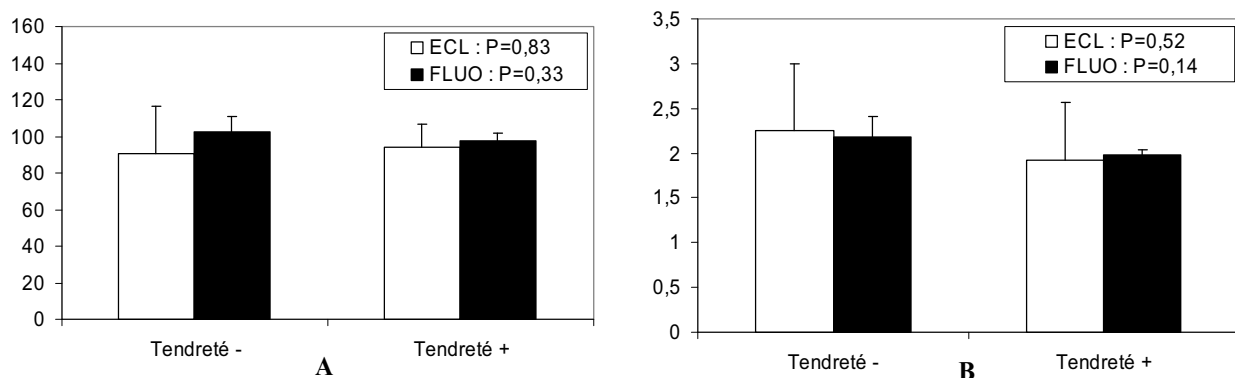


Figure 1 : Western Blot (I) et Dot Blot (II) couplés à une révélation ECL (A et C) et FLUO (B et D).

Quantification : le logiciel ImageQuant (Amersham) est utilisé pour quantifier les Western et Dot Blot. Pour les Westerns, l'intensité des bandes des échantillons est normalisée par rapport à l'intensité du mélange de référence. Les moyennes et coefficients de variation sont ensuite calculés pour chaque individu. Les mêmes opérations sont effectuées pour les groupes de tendreté identique, pour lesquels les moyennes sont calculées à partir des moyennes des individus composant ce groupe. Pour les Dot Blot, la valeur d'un spot est normalisée par rapport à la somme de tous les spots du Dot Blot. Chaque individu est moyenné sur les 6 spots d'un Dot Blot. L'écart-type et le coefficient de variation sont calculés de la même manière que pour les Western Blot, pour les individus et les groupes de tendreté. La significativité de la différence entre groupes est évaluée par T-test.

Résultats et discussion

Comparaison ECL / FLUO

**Figure 2 :** Comparaison des deux groupes de 4 animaux tendreté différente par Western Blot (A) et Dot Blot (B) utilisant soit une révélation chimiluminescente, soit par fluorescence.

Les résultats obtenus par une révélation fluorescente montrent une variabilité technique moyenne réduite d'un facteur 3 à 5 par rapport à une révélation chimiluminescente (respectivement 6,3 vs 21,4% pour les Westerns et 6,4 vs 33,4% pour les Dots). Cette différence de variabilité technique est certainement due au fait que la révélation chimiluminescente est une méthode plus indirecte que la révélation fluorescente. Cette diminution de variation avec le système Odyssey permet d'obtenir des résultats plus précis. Dans le cadre de la validation de marqueurs, les différences entre groupes pourront être plus précisément déterminées. Ceci est illustré par la diminution des P-value entre ECL et FLUO (Figure 2). La révélation par fluorescence apparaît donc mieux adaptée.

Comparaison Western Blot / Dot Blot en fluorescence

Les résultats obtenus par des Western Blot et Dot Blot, ont montré des variations techniques comparables (Figure 2) entre les groupes de 4 animaux de tendreté différente (6,4% pour les Western contre 6,3% pour les Dot en fluorescence). Les deux techniques sont donc aussi fiables l'une que l'autre.

Cependant, chaque individu étant déposé 6 fois sur un Dot Blot contre 1 fois sur un Western Blot, les Dots Blots ont permis d'obtenir une quantité de données 6 fois plus importante lors d'une même expérience que les Westerns Blots. Les Dots Blots constituent donc une méthode de choix pour la validation de marqueurs de tendreté pour notre étude.

Conclusion

Cette étude a permis de montrer qu'une révélation par fluorescence est beaucoup plus fiable qu'une révélation chimiluminescente pour la validation de marqueurs de la tendreté de la viande. De plus, ce genre d'analyse est beaucoup plus rapide avec des Dot Blots qu'avec des Westerns Blots, tout en étant aussi fiable. Le gain de fiabilité apporté par une révélation fluorescente permettrait de réduire le nombre de répétitions pour un même échantillon sur un Dot Blot, grâce à quoi un nombre plus important d'individus différents pourraient être déposés sur une même membrane de Dot Blot. La normalisation par rapport à l'intensité totale des spots du Dot Blot n'en sera que meilleure pour une comparaison inter-Dots. La méthode retenue pour la validation de marqueurs de la tendreté de la viande bovine est l'analyse par Dot Blot et une révélation par fluorescence. Cette méthodologie sera appliquée sur différents types de muscles, d'animaux et de races pour une liste d'une trentaine de marqueurs potentiels de la tendreté à valider.

Références bibliographiques

Bouley, J., Chambon, C., Picard, B., 2004. Proteomics. 4 (6), 1811-1824.

Remerciements

Les auteurs remercient C. Barboiron pour son assistance technique, D. Taillandier pour son assistance sur l'Odyssey, l'UE de Bourge et l'abattoir de Theix. Le projet MUGENE a été financé par l'ANR et APIS-GENE.

Validation d'un marqueur potentiel de la tendreté de la viande bovine

Validation of one potential marker of beef tenderness

GUILLEMIN N. (1,2), LEVEZIEL H. (2), G. RENAND (3), D. MICOL (1), J-F. HOCQUETTE (1), PICARD B. (1)

(1) UR1213, Unité de Recherches sur les Herbivores, INRA de Theix, 63122 Saint-Genès-Champagnelle

(2) UMR1061, Unité de Génétique Moléculaire Animale, INRA-Université de Limoges, Faculté des Sciences et Techniques, 87060 Limoges Cedex

(3) INRA, UR337, Station de Génétique Quantitative et Appliquée 78352 Jouy-en-Josas, France,

INTRODUCTION

La tendreté de la viande bovine est une qualité sensorielle essentielle pour le consommateur. Elle est dépendante de multiples caractéristiques du muscle, sujette à une grande variabilité non maîtrisée par la filière viande bovine et source d'insatisfaction des consommateurs. Plusieurs programmes de recherche tels que MUGENE (Genanimal) ont permis d'établir une liste de marqueurs biologiques de la tendreté par des approches de génomique fonctionnelle (Hocquette *et al.*, 2007). Afin d'apporter à la filière viande bovine française des outils de prédiction du potentiel de tendreté d'un animal, ces marqueurs doivent être validés dans d'autres races à viande françaises, dans différents types de muscles et d'animaux. Plusieurs marqueurs sont actuellement étudiés comme par exemple Hsp27, MDH... Le marqueur potentiel présenté ici est la Myosin Binding Protein H (MyBP-H), protéine de structure myofibrillaire (Bouley *et al.*, 2004). Le but ultime est d'établir une liste de quelques marqueurs dont la relation avec la tendreté est validée pour mettre au point un test de prédiction du potentiel de tendreté pour la filière viande bovine française, basé sur l'utilisation de ces marqueurs.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. ECHANTILLONS

Les animaux sont des taurillons de 15 et 19 mois et des bœufs de 30 mois de race Charolaise (programme MUGENE Genanimal). Les muscles *Longissimus Thoracis* (LT) et *Semitendinosus* (ST) ont été prélevés sur la carcasse. La tendreté a été évaluée par des tests Warner-Braztler (WB-tendreté mécanique) sur le LT et le ST après 21 jours de maturation. Des lots d'animaux de tendreté extrême, inférieure et supérieure, ont été constitués pour chaque muscle en fonction de la note de Warner-Braztler. Les lots comprennent 4 animaux pour les taurillons, et 3 pour les bœufs. Les protéines ont été extraites sur le muscle frais et dosées par spectrométrie.

1.2. DOT BLOT

Quinze µg d'un échantillon sont déposés sur une membrane de nitrocellulose à l'aide d'une plaque de dépôt Schleider et Schuell. Les échantillons sont déposés 6 fois chacun. La membrane est saturée dans une solution à 10% de lait écrémé. L'anticorps primaire de souris anti-MyBPH (Abnova) a été validé au préalable pour ce type d'échantillon par Western Blot. Il est dilué au 1/4000^{ème} et hybridé une heure à 37°C. Le second anticorps anti-souris, couplé à un fluorochrome (LI-COR), est hybridé ensuite 45 minutes à 37°C. Après lavages, la membrane est scannée sur l'Odysee (LI-COR) à une longueur d'onde de 800nm.

1.3. QUANTIFICATION ET STATISTIQUES

La quantification de la fluorescence des spots est réalisée avec le logiciel ImageQuant (Amersham). Cette valeur arbitraire est normalisée par rapport à une gamme de

dilution d'un mélange de 29 animaux utilisé comme référence. Les différences entre groupes sont analysées par test de Student.

2. RESULTATS

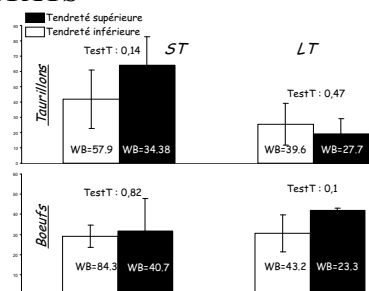


Figure 1. Quantité de MyBP-H dans les différents lots d'animaux analysés par Dot Blot

Aucune différence significative n'est observée entre lots dans le muscle LT de taurillons et le muscle ST de bœufs. En revanche, une tendance est observée dans le muscle LT de bœufs (T-test = 0,1) et le muscle ST de taurillons (T-test = 0,14). Le lot de tendreté supérieure (Warner-Braztler faible) présente une quantité de MyBP-H plus élevée que le lot de tendreté inférieure (Warner-Braztler élevé).

3. DISCUSSION

Ces données préliminaires ne permettent pas de confirmer clairement la relation entre la présence de MyBP-H et la tendreté de la viande dans les deux muscles LT et ST des bœufs et taurillons. Cependant, les quantités supérieures de MyBP-H observées dans le muscle ST des taurillons et le muscle LT des bœufs de tendreté supérieure, sont en accord avec ceux de Bouley *et al* (2004) sur du muscle ST de taurillons classé sur la base de la tendreté sensorielle. Cette analyse sur MyBP-H est poursuivie dans d'autres types d'animaux (vaches, veaux) et races (Blonde d'Aquitaine, Limousine...) pour confirmer ou infirmer cette tendance.

CONCLUSION

La tendreté étant multi-factorielle et très complexe, l'implication d'un marqueur donné est probablement fonction d'une race, d'un type de muscle et du contexte de vie particulier de l'animal, d'où la nécessité de développer des tests basés sur plusieurs marqueurs de métabolismes divers, sélectionnés d'après les résultats de cette étude, et non sur un seul.

Cette étude est financée par l'ANR et APIS-GENE dans le cadre du programme MUGENE (GENANIMAL).

Les auteurs remercient C. Barboiron, B. Meunier, N. Dunoyer, D. Taillandier, l'UE de Bourges et l'abattoir de Theix.

Bouley, J., Chambon, C., Picard, B. 2004. 3R, 87-89

Hocquette, J-F., Bernard, C., *et al*, 2007. 3R, 117-120

ANALYSE APPROFONDIE DE MARQUEURS DE LA TENDRETE DE LA VIANDE BOVINE, ETUDE DE FONCTIONNALITE DES GENES ET ANALYSES DES POLYMORPHISMES

GUILLEMIN Nicolas (2^{ème} année de thèse)- Equipe C2M

Responsables : Brigitte PICARD (C2M – Theix), Hubert LEVEZIEL (UGMA – Limoges)

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

La tendreté de la viande bovine est une qualité sensorielle essentielle pour le consommateur, dans un secteur soumis à de fortes contraintes. Cependant, elle a une origine complexe et multifactorielle, ce qui la rend difficilement maîtrisable par la filière viande (Picard *et al.*, 2007).

Dans l'optique d'améliorer la compréhension et la prédiction de la tendreté, une multitude de facteurs ont été identifiés. Leur impact sur la tendreté dépend du système d'élevage, de la race bovine, des individus et du type de muscle. Les tests de prédiction de la tendreté mis au point en Australie et aux USA ne sont pas applicables aux races françaises. Il est donc nécessaire pour la filière, de renforcer ses connaissances sur la tendreté de la viande bovine, afin d'améliorer les conditions d'élevage et de sélection des bovins, et de disposer de tests fiables d'estimation de la tendreté.

OBJECTIFS

L'objectif de ma thèse est de valider au niveau protéique des marqueurs biologiques de la tendreté identifiés par des approches de génomique fonctionnelle, en particulier dans le cadre des programmes MUGENE (projet ANR APISGENE/Genanimal) et ProSafeBeef (projet européen) et au cours des thèses effectuées au sein de l'équipe (Bouley *et al.*, 2005, Bernard *et al.*, 2007). Les marqueurs validés seront choisis afin de développer à terme un test commercial de prédiction de la tendreté basé sur les protéines. Des polymorphismes seront recherchés dans les gènes des marqueurs validés afin d'exploiter la variabilité génétique pour sélectionner des bovins en faveur de la tendreté de leur viande.

De plus, une analyse biologique des marqueurs validés permettra de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la tendreté pour améliorer les systèmes de production de la filière française.

APPROCHE EXPERIMENTALE

L'étude porte dans un premier temps sur l'ensemble des animaux du programme MUGENE 2003, c'est-à-dire 23 bœufs et 29 taurillons de race Charolaise, et sur deux muscles, le *Longissimus Thoracis* (LT) et le *Semitendinosus* (ST). Par la suite, l'étude sera étendue à d'autres types d'animaux et races françaises (notamment la race auvergnate Salers).

Les validations de marqueurs se feront par quantifications des protéines d'intérêt avec une technique immunologique, le Dot-Blot. Les analyses

génétiques seront effectuées à l'UGMA de Limoges à partir des marqueurs validés au niveau protéique.

PRINCIPAUX RESULTATS

La technique de Dot-Blot utilisée dans cette étude a été mise au point et validée afin de répondre aux objectifs de la thèse, et fait l'objet d'un article dans le *Journal of Physiology and Pharmacology* (article soumis).

Jusqu'à présent, une analyse des muscles LT et ST des 23 bœufs et 29 taurillons du programme MUGENE a été effectuée sur 6 marqueurs potentiels de la famille des protéines de stress (Hsp20, Hsp27, Hsp40, Hsp70-1A/B, Hsp70-8, α B-Crystalline). Les résultats montrent qu'aucune protéine ne peut expliquer à elle seule une variation de la tendreté sur l'ensemble des animaux. C'est pourquoi une équation de prédiction de cette qualité sera développée à partir des résultats obtenus sur l'ensemble des protéines analysées.

De plus, ces résultats ont permis de dégager des différences significatives d'abondance de ces 6 protéines de stress, entre différents muscles et types d'animaux. Ainsi, les résultats montrent que ces protéines de stress sont toutes corrélées positivement à un métabolisme de type oxydatif, ce qui est en accord avec les données bibliographiques disponibles uniquement chez l'humain. En effet, ces protéines sont impliquées dans des processus de repliement et de protection des protéines lors d'un stress oxydatif, et d'inhibition de l'apoptose.

CONCLUSION

La tendreté de la viande étant complexe, les résultats obtenus doivent être complétés par des quantifications portant sur d'autres protéines (enzymes, protéines structurales...) afin de développer une équation de prédiction. Les données générées permettront également de mieux connaître le fonctionnement du muscle bovin en fonction de différents systèmes de production.

Je remercie l'IE de Bourges, ainsi que l'IE et l'équipe de l'abattoir de Theix

REFERENCES

- Bernard C, *et al.* 2007. New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 5229-5237.
- Bouley J, *et al.* 2005. Proteomic analysis of bovine skeletal muscle hypertrophy. *Proteomics* 5, 490-500.
- Picard B, *et al.* 2007. Caractéristiques des muscles et de la viande des principales races bovines allaitantes du massif central. *Sciences des Aliments* 27/2, 168-180.

Nicolas GUILLEMIN (2^{ème} année de thèse)
INRA UR1213, Unité de Recherches sur les Herbivores
63122 Saint-Genès-Champanelle, France.
04-73-62-47-05
E-mail : nicolas.guillemine@clermont.inra.fr

Directeurs et responsables de thèse : Brigitte PICARD et Hubert LEVEZIEL

ETUDE DE MARQUEURS DE TENDRETE DE LA VIANDE BOVINE : INFLUENCE DU METABOLISME MUSCULAIRE

GUILLEMIN, N. ; LEVEZIEL, H. ; PICARD, B.

La tendreté de la viande bovine est un critère d'appréciation majeur des consommateurs, dont la variabilité n'est pas maîtrisée par la filière. Depuis quelques années différents programmes de génomique fonctionnelle ont révélé des marqueurs potentiels de la tendreté, au niveau ADN, ARN et protéines. La filière viande bovine se montre intéressée par l'exploitation des propriétés de ces marqueurs sous la forme d'un test commercial de prédiction de la tendreté du vivant de l'animal. Cependant, le profil d'expression de ces marqueurs, au niveau protéique, est fortement dépendant des conditions de production : muscle choisi, type d'animal, et conditions d'élevage. Il est donc important de connaître quelles conditions peuvent être favorables ou défavorables à l'expression des marqueurs protéiques potentiels de la tendreté. Cette qualité sensorielle pourrait ainsi être mieux gérée tout au long de la vie de l'animal.

Afin de répondre à cette question, l'abondance des protéines d'intérêt est analysée sur un grand nombre d'échantillons (provenant de muscles et type d'animaux différents) par une technique immunologique, le Dot-Blot appliquée sur une trentaine de protéines différentes à l'aide d'anticorps spécifiques.

Les résultats actuels ont été obtenus en quantifiant les protéines de stress Hsp20, Hsp27, Hsp40, Hsp70-1A/B, Hsp70-8 et l' α B-crystalline. Les données générées montrent que l'expression de ces protéines est fortement associée à un métabolisme de type oxydatif, en accord avec les données bibliographiques disponibles uniquement pour le muscle humain. De plus, les résultats montrent une influence positive des hormones androgènes sur le niveau d'expression de ces protéines de stress plus élevé chez les taurillons par rapport aux boeufs.

Les analyses d'une vingtaine d'autres marqueurs sont en cours et permettront de préciser quelles sont les influences des différents systèmes de production sur l'expression de marqueurs protéiques de la tendreté de la viande.

Effect of muscle and animal types on the expression of HSPs in cattle muscle

N. Guillemin^{1*}, H. Levéziel², C. Jurie¹, J.F. Hocquette¹ and B. Picard¹

¹INRA, UR1213 Herbivores, Site de Theix, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France.

²INRA-Université de Limoges, UMR 1061, F87060 Limoges, France.

*Correspondence: nicolas.guillemin@clermont.inra.fr

Introduction

Beef tenderness is a very important criterion for consumers. Several recent genomics programs have revealed some potential meat tenderness biomarkers (DNA, RNA, proteins) (Hocquette *et al.*, 2007). Among these, members of the Heat Shock Protein family (HSP): Hsp20, Hsp27, Hsp40, Hsp70-1A/B, Hsp70-8 and α B-crystallin were differentially expressed between extreme groups of tenderness and appeared to be good markers of beef tenderness. The aim of this study is to determine the expression of protein HSPs in different muscles or animal types.

Materiel and methods

The study was conducted on 104 different samples corresponding to 29 Charolais young bulls and 23 Charolais steers from the INRA experimental program MUGENE (funded by ANR and APIS-GENE through the GENANIMAL call). Animals were slaughtered at the experimental slaughterhouse of our Unit in compliance with the current ethical guidelines for animal welfare. Muscle samples from *Longissimus Thoracis* (LT, mixed fast oxidoglycolytic) and *Semitendinosus* (ST, fast glycolytic) were excised from each animal (29 young bulls and 23 steers) within 15 minutes of slaughter. Muscle samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until protein extraction, performed according to Bouley *et al.* (2004) in the denaturation buffer (8.3M urea, 2M thiourea, 1% DTT, 2% CHAPS). The protein concentration was determined by spectrophotometry with Bradford assay. Protein extracts were stored at -20°C.

Protein quantification was done by Dot-Blot, as described by Guillemin *et al.* (2009). All samples were replicated four times.

The primary antibodies were used according to the following concentrations, at 37°C during 90 minutes: Hsp20 (Santa Cruz) 1/200, Hsp27 (Santa Cruz) 1/3000, Hsp40 (Santa Cruz) 1/250, Hsp70-1A/B (Abnova) 1/2000, Hsp70-8 (Santa Cruz) 1/250 and α B-crystallin (Assay Designs) 1/500. The second fluorescent antibody anti-mouse (LI-COR) was used at 1/20000 at 37°C for 30 minutes.

The statistical analysis was performed using the GLM procedures of SAS. The effects of animal type, muscle and animal type X muscle interaction were tested. When significant effects were detected, differences were evaluated by the PDIF option of SAS. No animal type X muscle interactions were observed, so only main effects are reported.

Results

Animal type effect (Table 1): whereas the expression of Hsp40 and Hsp70-1A was not significantly different between bulls and steers, α B-crystallin, Hsp20 and Hsp27 were found to be expressed more in young bulls compared with steers, for the two muscles. These proteins constitute a functional complex, according to bibliographic data available in human databases.

Muscle type effect (Table 1): all the HSPs, except Hsp27, were found more expressed in LT than in ST muscle. It is well documented in the literature that the muscles of young bulls are more oxidative than steers, due to the difference in androgenic hormones (higher in young bulls) (Cassar-Malek *et al.*, 1998). Moreover, LT is more oxidative than the ST. Consequently, we can conclude that HSPs are associated with oxidative metabolism.

Table 1. Expression of different HSPs from Charolais bulls and steers in Longissimus Thoracis (LT) and Semitendinosus (ST) muscles.

	Animal type		SE	Effect	Muscle		SE	Effect
	Bulls	Steers		<i>P-value</i>	LT	ST		<i>P-value</i>
α B-crystallin	16.4	10.6	0.66 (0.74)	0.0001	17.8	9.2	0.66	0.001
Hsp20	16.2	11.3	0.43 (0.48)	0.0001	16.9	10.7	0.38	0.0001
Hsp27	11.7	5.9	0.63 (0.7)	0.0001	8.54	9.15	0.54	0.43
Hsp40	15.4	14.5	0.43 (0.48)	0.15	16.4	13.5	0.43	0.0001
Hsp70-1A	14.2	14.6	0.56 (0.62)	0.63	17.8	11	0.61	0.0001
Hsp70-8	15.1	16.7	0.33 (0.36)	0.0017	16.5	15.4	0.29	0.0122

Protein quantities are given in arbitrary units.

*SE for bulls out of brackets and for steers between brackets

Discussion / Conclusion

All these HSPs were found to be expressed more in an androgenic / oxidative metabolism, which is in accordance with human proteins databases. These proteins are implicated in chaperone activities and are also apoptosis inhibitors. They are induced by a thermal or oxidative stress, produced for example during a muscular work.

So, these results showed that different beef production systems influence the expression of some potential beef tenderness markers, by muscle effects and animal types. Same experiments will be done on around twenty others proteins, such as metabolic enzymes and structural proteins.

Acknowledgements

The authors thank Bruno Meunier, Isabelle Cassar-Malek, Christiane Barboiron, Nicole Dunoyer, Daniel Taillandier, the INRA experimental farms of Bourges and the experimental slaughter house or our Unit. The authors also thank Gilles Renand (INRA, SGQA UNIT, Jouy-en-Josas) for the conception of the experimental design of the MUGENE program.

References

- Bouley, J., Chambon, C., Picard, B., 2004. Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 4: 1811-1824.
- Cassar-Malek, I., Listrat, A., Picard, B., 1998. Contrôle hormonal des caractéristiques des fibres musculaires après la naissance. *INRA Production Animale* 11: 365-377.
- Guillemin, N., Meunier, B., Jurie, C., Cassar-Malek, I., Hocquette, J. F., Levéziel, H., Picard, B., 2009. Validation of a dot-blot quantitative technique for large-scale analysis of beef tenderness biomarkers. *Journal of Physiology and Pharmacology*: Submitted.
- Hocquette, J. F., Lehnert, S. A., Barendse, W., Cassar-Malek, I., Picard, B., 2007. Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. *Animal* 1: 159-173.

STRATEGIE DE PHENOTYPAGE HAUT DEBIT DE LA TENDRETE DE LA VIANDE BOVINE

Nicolas GUILLEMIN*, Catherine JURIE, Bruno MEUNIER, Hubert LEVEZIEL¹, Jean-François HOCQUETTE, Brigitte PICARD

Unité de Recherches sur les Herbivores, UR1213, Saint-Genès-Champanelle

¹Unité de Génétique Moléculaire Animale, UMR1061, INRA-Université de Limoges, 87060 Limoges Cedex

Nicolas.guillemmin@clermont.inra.fr

Poster ☐ - Oral ☒

CT 4

INTRODUCTION

La tendreté de la viande bovine est un critère d'insatisfaction important pour les consommateurs, car sujet à une grande variabilité non maîtrisée. Divers programmes de génomique fonctionnelle ont identifié des marqueurs potentiels de la tendreté, au niveau ADN, ARN, et protéique, sur un nombre restreint d'animaux et de contextes de production. Un test de prédiction phénotypique de la tendreté est en cours de développement à partir des données des programmes antérieurs. Pour cela, il est nécessaire d'analyser des dizaines de protéines différentes sur un grand nombre d'animaux et dans plusieurs contextes de production.

Afin de réaliser ces phénotypes, une technique de quantification de protéine par Dot-Blot a été mise au point. Jusqu'à présent, ce Dot-Blot protéique a été utilisé pour l'analyse quantitative de plus de vingt protéines différentes sur une centaine d'échantillons avec une grande fiabilité technique. L'ensemble des données de phénotypage générées sera utilisé pour la mise au point d'une équation de prédiction.

MATERIEL ET METHODES

L'étude a été conduite sur 102 échantillons provenant de 28 taurillons et 23 bœufs (B) de race Charolaise du programme expérimental MUGENE (ANR/GENANIMAL). Les animaux ont été abattus à l'abattoir expérimental en respectant les conditions d'éthique et de bien-être animal. Les échantillons des muscles *Longissimus Thoracis* (LT) et *Semitendinosus* (ST) ont été prélevés 10 minutes après l'abattage sur chaque animal et immédiatement congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C. L'attribution d'une note de dureté de la viande par la technique de Warner-Braztler a été effectuée après 14 jours de maturation pour le LT, et 21 jours pour le ST. Une note de tendreté a également été attribuée par un jury d'analyse sensorielle pour le muscle LT. Les extractions protéiques ont été effectuées selon Bouley *et al* (2004).

Les quantifications par Dot-Blot ont été réalisées selon le protocole décrit par Guillemmin *et al* (2009). Les données ont été analysées par

régression multiple pas-à-pas avec le logiciel SAS (option FORWARD).

RESULTATS

Au total, 23 protéines différentes ont été quantifiées sur 102 échantillons de muscle bovin, avec un coefficient de variation technique moyen de 10%, quelle que soit la protéine considérée. Ces résultats ont permis de valider la relation avec la note de tendreté pour certaines telles que CapZ-β et MLC-1F, protéines de structure (Figure 1).

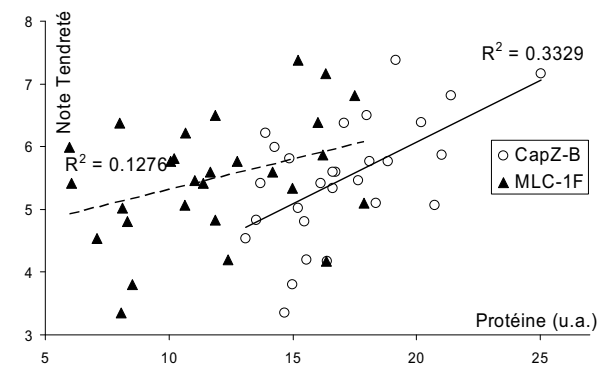


Figure 1. Quantités des protéines CapZ-β et MLC-1F en fonction de la note de tendreté sensorielle

DISCUSSION ET CONCLUSION

La bonne répétabilité technique quelle que soit la protéine analysée montre que la technique de phénotypage par Dot-Blot est fiable et applicable à l'analyse de dizaines de protéines très différentes. Le Dot-Blot est donc une technique bien adaptée au phénotypage haut débit sur des dizaines de protéines, en complémentarité des programmes de génomique du bovin.

Les résultats acquis par cette stratégie vont permettre d'établir une équation prédictive de la tendreté pour chaque muscle et type d'animal à partir d'une liste de marqueurs biologiques validés. Ceci constitue une étape majeure vers la mise au point d'un test commercial de prédiction de la tendreté.

REFERENCES

- Bouley, J., Chambon, C., Picard, B., 2004. Proteomics 4 (6): 1811-1824.
- Guillemmin, N., Meunier, B., Jurie, C., Cassar-Malek, I., Hocquette, J. F., Levéziel, H., Picard, B., 2009. Journal of Physiology and Pharmacology 60 (Suppl 2).

Mise en équation de la tendreté de la viande bovine à partir de validations de marqueurs potentiels

Setting equation of beef from validation of potential markers

GUILLEMIN N., JURIE C., RENAND G. (1), HOCQUETTE J-F., LEPETIT J. (2), LEVEZIEL H. (3), PICARD B. UR1213, Recherches sur les Herbivores, (2) UR 370 Qualité des Produits Animaux, INRA, Theix, 63122 Saint-Genès-Champagnelle,

(1) UR337, Station de Génétique Quantitative et Appliquée, INRA, 78352 Jouy-en-Josas

(3) UMR1061, Unité de Génétique Moléculaire Animale, INRA-Université de Limoges, Faculté des Sciences et Techniques, 87060 Limoges Cedex

INTRODUCTION

La tendreté de la viande bovine est un caractère complexe et multifactoriel, source d'insatisfaction des consommateurs. Afin de répondre à une demande de la filière viande bovine, divers programmes de génomique fonctionnelle (transcriptomique et protéomique) ont identifié des marqueurs potentiels de la tendreté (Hocquette *et al*, 2007). L'objectif de cette étude était de valider une liste de 22 marqueurs biologiques potentiels. Pour ce faire, leur expression a été quantifiée au niveau protéique dans le muscle *Longissimus Thoracis* (LT) de taurillons Charolais, par une technique immunologique, le Dot-Blot (Guillemin *et al*, 2009). L'analyse de ces « nouvelles » données phénotypiques doit permettre d'identifier les protéines les plus explicatives de la tendreté, par une analyse de régression linéaire multiple pas-à-pas. Une équation prédictive de la tendreté, fonction du phénotypage des protéines retenues, sera mise au point et servira de base pour le développement de tests de prédiction biologiques de la tendreté.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Echantillons

L'étude a été conduite sur 28 taurillons de race Charolaise du programme expérimental MUGENE (ANR/GENANIMAL). Les animaux ont été abattus en respectant les conditions d'éthique et de bien-être animal. Les échantillons des muscles LT ont été prélevés puis immédiatement congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C en vue d'une extraction protéique effectuée selon le protocole de Bouley *et al* (2004). La tendreté de ces muscles a été évaluée après 21 jours de maturation par mesures mécaniques selon le test de Warner-Braztler (WB) et par un jury de dégustation (TS).

1.2. Phénotypage par Dot-Blot

Les analyses quantitatives de 22 protéines ont été effectuées d'après le protocole de Guillemin *et al* (2009) à l'aide d'anticorps spécifiques de chacune des protéines.

1.3. Analyses statistiques

Les données ont été analysées par régression multiple pas-à-pas à l'aide de SAS (option FORWARD).

2. RESULTATS

Sur 4 animaux extrêmes, des approches protéomiques avaient mis en évidence une relation significative entre 22 protéines et les estimations mécaniques et sensorielles de la tendreté. Ces protéines ont été analysées sur l'ensemble des 28 taurillons. Dans ce cadre la relation avec la tendreté est loin d'être aussi claire, l'établissement de relation linéaire simple entre une protéine et une note de tendreté s'avérant peu fiable compte tenu de la variabilité phénotypique des 28 taurillons (données non illustrées dans ce résumé).

Toutefois, l'analyse par régression multiple a permis de montrer qu'au moins trois de ces protéines sont explicatives de la tendreté estimée par les deux approches mécanique et sensorielle (Figure 1). Elles correspondent à des protéines contractiles : chaîne lourde de myosine rapide (MyHC-II) ; du métabolisme : la Malate deshydrogénase I (MDH1) et de structure : CapZ-β (Tableau 1).

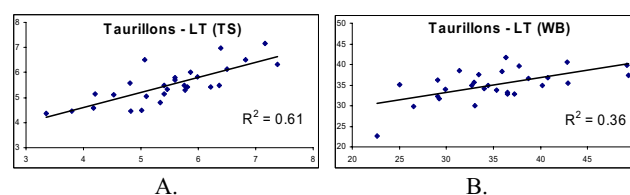


Figure 1. Corrélation entre la tendreté prédite par le modèle (ordonnée) et la tendreté mesurée dans les échantillons (abscisse), en TS (A) et WB (B).

LT - WB	LT - TS
CapZ-β (24%)	CapZ-β (33%)
MyHC-II (12%)	MDH1 (20%)
	MyHC-II (7%)

Tableau 1. Protéines explicatives de la tendreté ($P < 0,05$) retenues par une analyse de régression multiple pas-à-pas pour expliquer la note de tendreté (WB ou TS) et le % de variabilité expliquée par chaque protéine.

CONCLUSION

La relation d'une protéine avec la tendreté mise en évidence sur de faibles effectifs n'est pas systématiquement validée sur des effectifs plus larges. Les analyses ont montré que les protéines significativement explicatives de la tendreté diffèrent selon les contextes, ce qui nous amène à envisager le développement d'une équation prédictive par jeu de données homogènes (en fonction du type d'animal, du système de production et du muscle). Des analyses statistiques plus fines seront effectuées afin de préciser les équations. De plus, des phénotypes portant sur les protéines sélectionnées comme marqueurs biologiques seront effectués sur d'autres séries d'échantillons (muscles, type d'animaux, races) afin de valider les équations développées jusqu'à présent, voir de les adapter selon le contexte étudié.

Cette étude est financée par l'ANR et APIS-GENE dans le cadre du programme MUGENE (GENANIMAL).

Les auteurs remercient Christiane Barboiron, Bruno Meunier, l'UE de Bourges et l'abattoir de Theix.

Bouley, J., *et al*, 2004. Proteomics, 4: 87-89

Guillemin, N., *et al*, 2009. J Physiol and Pharmacol, 60, Suppl 2

Hocquette, J-F., *et al*, 2007. Renc Rech Ruminants, 14, 117-120

ANALYSE APPROFONDIE DE MARQUEURS DE LA TENDRETE DE LA VIANDE BOVINE, ETUDE DE FONCTIONNALITE DES GENES ET ANALYSES DES POLYMORPHISMES

GUILLEMIN Nicolas (3^{ème} année de thèse)- Equipe C2M

Responsables : Brigitte PICARD (C2M – Theix), Hubert LEVEZIEL (UGMA – Limoges)

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

La tendreté de la viande bovine est une qualité sensorielle essentielle pour le consommateur, dans un secteur soumis à de fortes contraintes. Cependant, elle a une origine complexe et multifactorielle, ce qui la rend difficilement maîtrisable par la filière viande (Picard *et al.*, 2007).

Dans l'optique d'améliorer la compréhension et la prédiction de la tendreté, une multitude de facteurs ont été identifiés. Leur impact sur la tendreté dépend du système d'élevage, de la race bovine, des individus et du type de muscle. Les tests de prédiction de la tendreté mis au point en Australie et aux USA ne sont pas applicables aux races françaises. Il est donc nécessaire pour la filière, de renforcer ses connaissances sur la tendreté de la viande bovine, afin d'améliorer les conditions d'élevage et de sélection des bovins, et de disposer de tests fiables d'estimation de la tendreté.

OBJECTIFS

L'objectif de ma thèse est de valider au niveau protéique un ensemble de 24 marqueurs biologiques de la tendreté identifiés par des approches de génomique fonctionnelle, en particulier dans le cadre du programme MUGENE (projet ANR APISGENE/Genanimal) et au cours des thèses effectuées au sein de l'équipe (Bouley *et al.*, 2005, Bernard *et al.*, 2007). Les marqueurs validés seront choisis afin de développer à terme un test commercial de prédiction de la tendreté basé sur les protéines.

De plus, une analyse biologique des marqueurs validés permettra de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la tendreté pour améliorer les systèmes de production de la filière française.

APPROCHE EXPERIMENTALE

L'étude porte sur l'ensemble des animaux du programme MUGENE (années 2003 et 2005). Il s'agit de 67 taurillons (17 mois) et 44 boeufs (30 mois) de race Charolaise. Pour chaque animal, les muscles *Longissimus Thoracis* (LT) et *Semitendinosus* (ST) ont été prélevés 15 minutes après abattage et immédiatement congelés dans l'azote liquide à -80°C jusqu'à extraction. Les 24 protéines ont été quantifiées par Dot-Blot, technique immunologique, d'après la méthode décrite par Guillemin *et al.* (2009).

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel SAS 9.1.

PRINCIPAUX RESULTATS

Premièrement, les résultats ont montré qu'il existe des effets biologiques influençant l'expression de 20 des 24 marqueurs de tendreté analysés. Par exemple, les taurillons expriment plus de protéines de stress de la famille Hsp20 que les boeufs.

D'autre part, les données ont permis de révéler des corrélations entre les différents marqueurs, ce qui m'a conduit à réaliser un interactome des protéines du muscle bovin, complété par les données disponibles chez l'humain et la souris.

Enfin, des analyses préliminaires ont montré que l'implication des marqueurs dans la tendreté est dépendante des contextes d'analyse (type d'animal et muscle).

CONCLUSION

Ce travail a permis d'identifier des effets biologiques sur l'expression de marqueurs de la tendreté. La connaissance des ces effets permettra de mieux contrôler la production d'une viande tendre du vivant de l'animal en influençant les méthodes d'élevage. La réalisation de l'interactome musculaire bovin permettra de mieux comprendre les relations entre les marqueurs de tendreté d'une part, et les mécanismes cellulaires mettant en place cette qualité d'autre part. A terme, les connaissances apportées permettront de mieux comprendre la mise en place de la tendreté.

La totalité des résultats sera analysée de manière approfondie afin de développer des équations de prédiction de tendreté. Cela constituera la base d'un test de prédiction de cette qualité.

Je remercie l'IE de Bourges, ainsi que l'IE et l'équipe de l'abattoir de Theix.

REFERENCES

- Bernard C, et al.** 2007. New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 5229-5237.
- Bouley J, et al.** 2005. Proteomic analysis of bovine skeletal muscle hypertrophy. *Proteomics* 5, 490-500.
- Guillemin N, et al.** 2009. Validation of a dot-blot quantitative technique for large-scale analysis of beef tenderness biomarkers. *Journal of Physiology and Pharmacology* 60, 91-97.
- Picard B, et al.** 2007. Caractéristiques des muscles et de la viande des principales races bovines allaitantes du massif central. *Sciences des Aliments* 27/2, 168-180.

VERS LA MISE AU POINT D'EQUATIONS DE PREDICTION DE LA TENDRETE DE LA VIANDE BOVINE
GUILLEMIN N., JURIE C., MICOL D., RENAND G.¹, HOCQUETTE J-F., PICARD B.
UR 1213 Unité de Recherches sur les Herbivores, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France
¹UMR 1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, 78352 Jouy-en-Josas, France
Introduction

La tendreté de la viande bovine est un critère important d'appréciation par les consommateurs. Cependant, cette qualité sensorielle présente une forte variabilité, non maîtrisée par la filière, qui est donc fortement demandeuse de tests de prédiction de cette qualité. Afin de mettre au point des tests pertinents en France, et sous l'impulsion de la filière viandes bovines, divers programmes de recherche ont été conduits. Depuis plusieurs années, ces programmes de génomique fonctionnelle ont permis d'identifier des marqueurs potentiels de la tendreté (Bernard et al., 2007, Guillemain et al., 2009a), au niveau ADN, ARN et protéines, dans divers contextes de production (races, muscles, types d'animaux). Des tests immunologiques utilisant des marqueurs protéiques, de par leur facilité d'utilisation, ont un grand intérêt pour la filière pour une application pratique au cours de la vie de l'animal et/ou à l'abattage. Pour développer de tels tests, des équations de prédiction de la tendreté à partir de l'abondance de marqueurs protéiques, doivent d'abord être mises au point.

L'objectif de notre étude est donc de mettre au point cet outil, utilisable à terme comme un test de prédiction de la tendreté, sur les muscles *Longissimus thoracis* (LT) et *Semitendinosus* (ST). Pour cela nous avons analysé la relation entre la tendreté et les abondances de 24 marqueurs protéiques potentiels de la tendreté, et établi des équations de prédiction.

Matériel et Méthodes

Nous avons utilisé les animaux du programme MUGENE (ANR GENANIMAL-APISGENE) (Hocquette et al., 2008), à savoir 67 taurillons et 44 bœufs de race Charolaise. Les taurillons ont été engraisés en système intensif à l'auge et les bœufs, castrés à 3 mois, ont été engraisés au pâturage. L'ensemble des animaux a été abattu à l'abattoir de l'INRA de Clermont-Ferrand / Theix, à 17 mois d'âge en moyenne pour les taurillons, 30 mois pour les bœufs. Les échantillons des muscles LT (entrecôte, N = 111) et ST (rond-de-gîte, N = 111), ont été prélevés dans les 10 minutes suivant l'abattage puis congelés dans l'azote liquide et stockés à -80°C jusqu'à leur analyse. Parallèlement les steaks de chacun des muscles ont été maturés à 4°C pendant 14 jours, puis congelés à -20°C. Après décongélation, ils ont été grillés à une température à coeur de 55°C, et une mesure de la force de cisaillement de chaque échantillon de viande a été réalisée à l'aide d'un appareil de Warner-Bratzler (WB).

A partir des échantillons musculaires, les protéines extraites ont été quantifiées par Dot-Blot, par la technique décrite par Guillemain et al. (2009b). Brièvement, des anticorps primaires spécifiques de chacune des 24 protéines ont été hybridés et révélés par des anticorps secondaires fluorescents, à partir de 15 µg de protéines totales de chaque échantillon. Les quantifications ont été réalisées d'après une gamme de normalisation.

L'ensemble des données disponibles (mesures WB et abondances des protéines) a été corrigé et centré pour tenir compte de l'effet année d'abattage (2003 ou 2005). Afin de calculer une équation prédictive, les régressions linéaires ont été effectuées par le module XLSTAT (version 7.5.2). Dans cette régression, les mesures WB corrigées de l'effet année ont constitué la variable dépendante à expliquer, et les abondances des 24 protéines, les variables quantitatives explicatives. Une équation a été établie pour chaque muscle. Afin d'apprécier la prédictibilité de l'équation pour chaque échantillon, la valeur absolue de la différence entre la valeur de WB prédite (Vp) par l'équation et celle mesurée (Vm) a été calculée, rapportée à la valeur mesurée, et exprimée en pourcentage ($|Vp - Vm| / Vm * 100$). Ceci est l'erreur de la prédiction.

Résultats et discussion

Une première régression linéaire a été effectuée sur l'ensemble des échantillons de ST d'une part, et de LT d'autre part, ce qui a permis d'établir une équation pour chaque muscle à partir de l'abondance des 24 marqueurs. Le coefficient de corrélation entre les valeurs WB prédites et mesurées est de +0,61 et +0,48 pour le ST et le LT respectivement. L'écart entre la note de WB prédite et mesurée est en moyenne de 116,8 % pour le ST, et 158,8 % pour le LT. Cela signifie que ces équations ne peuvent pas être utilisées de manière satisfaisante pour un test de prédiction de la tendreté.

Cependant, un examen des différences entre valeur prédite et valeur mesurée pour chaque échantillon sur l'ensemble de la population, montre que cette différence n'est pas homogène et dépend des échantillons, pour les deux muscles ST et LT. Ainsi, sur les 111 échantillons de chaque muscle, 70 pour le ST (soit 66 %) et 59 (soit 53 %) pour le LT, présentent une erreur de prédiction inférieure à 100 %. Ceci montre qu'à partir de ces 24 marqueurs, nous sommes en mesure de prédire la mesure de WB sur environ deux tiers de la population. Aussi, dans un deuxième temps, nous avons considéré

ces échantillons qualifiés de « prédictibles » pour affiner la prédiction à partir de l'abondance des 24 marqueurs. Ces échantillons présentent des valeurs WB mesurées très diverses. Dans ces conditions, le coefficient de corrélation entre les valeurs WB prédites et mesurées est de +0,87 et +0,82 pour le ST et le LT respectivement. Les protéines les plus explicatives de la tendreté et leurs coefficients respectifs dans l'équation, sont présentées dans le Tableau 1.

En termes de marqueurs, sur le muscle ST, la première équation sur l'ensemble des échantillons (N = 111) montre que PRDX6 (Peroxyredoxine 6) et LDHB (lactate déshydrogénase B) sont les variables les plus explicatives de la note de WB. Ces deux protéines sont retrouvées dans la seconde équation sur le groupe d'échantillons « prédictibles » (N = 70), ce qui montre leur robustesse dans l'estimation. Cette deuxième équation montre en outre que deux autres protéines sont importantes, Hsp27 (Heat Shock Protein) et MyHC (Myosin Heavy chain) II (IIa + IIx). Dans le muscle LT, la première équation montre l'importance de PRDX6. La seconde confirme l'importance de PRDX6, et révèle d'autres protéines (Tableau 1).

Ces équations prédictives montrent que PRDX6 est le seul marqueur commun aux 2 muscles, explicatif de la valeur de WB. Ce résultat est concordant avec l'étude de Jia et al. (2009), qui identifie PRDX6 comme un marqueur de tendreté pertinent dans le muscle LT, mais avec une relation inverse. Cette enzyme est impliquée dans la lutte contre le stress oxydant, comme les protéines Hsp27, Hsp20, CRYAB, Hsp40 et DJ-1. Cela montre que le stress oxydant joue un rôle important dans la prédiction de la tendreté. Les protéines contractiles, MyHC I, MyHC II et MyBP-H (Myosin Binding Protein H), apportent une contribution non négligeable aux équations. Enfin, LDHB, enzyme glycolytique, est fortement impliquée dans l'équation du muscle glycolytique ST.

Equations du muscle ST						Equations du muscle LT					
1ère équation			2ème équation			1ère équation			2ème équation		
Protéine	Coefficient	P-value	Protéine	Coefficient	P-value	Protéine	Coefficient	P-value	Protéine	Coefficient	P-value
PRDX6	1,73	0,006	PRDX6	2,88	< 0,0001	PRDX6	1,26	0,031	MyBP-H	0,93	0,002
LDHB	-1,23	0,032	Hsp27	-1,27	0,015	<i>Hsp20</i>	<i>0,66</i>	<i>0,064</i>	PRDX6	1,91	0,015
M-Calpaïne	1,43	0,169	LDHB	-1,27	0,038	<i>CRYAB</i>	<i>-0,45</i>	<i>0,067</i>	Myosine I	1,67	0,022
Hsp70-1B	0,97	0,180	Myosine II	-2,55	0,045	MyBP-H	0,37	0,109	Hsp40	-1,89	0,030
u-Calpaïne	-1,01	0,274	<i>u-Calpaïne</i>	<i>-1,61</i>	<i>0,096</i>	CapZ-β	-0,73	0,222	DJ-1	2,63	0,041
Hsp40	-0,87	0,301	MyBP-H	0,56	0,151	DJ-1	0,95	0,237	<i>CRYAB</i>	<i>-0,62</i>	<i>0,061</i>
Myosine II	-0,95	0,319	MLC-1F	-0,77	0,183	MLC-1F	0,51	0,296	<i>Hsp20</i>	<i>1,13</i>	<i>0,067</i>
CRYAB	-0,55	0,341	Myosine IIX	0,33	0,195	M-Calpaïne	-0,81	0,297	<i>Desmine</i>	<i>-1,12</i>	<i>0,068</i>
Eno1	0,72	0,362	Eno1	1,20	0,201	Hsp40	-0,63	0,303	<i>MLC-1F</i>	<i>1,22</i>	<i>0,084</i>

Tableau 1 : Paramètres des équations mises au point pour les muscles ST et LT.

Les protéines apportant une contribution significative à l'équation sont indiquées en gras, et avec une tendance en italique. Les 24 marqueurs ne sont pas tous indiqués pour une meilleure lisibilité.

D'autre part, la comparaison des échantillons dits « prédictibles » dans chacun des deux muscles montre que 70% de ceux-ci sont appariés, c'est à dire provenant du même animal. Ceci indique que ce caractère (« prédictible » / « imprédictible ») dépend de l'individu et du muscle. Pour les échantillons dits « imprédictibles », aucune équation basée sur ces 24 marqueurs n'est satisfaisante. Leur tendreté doit répondre à des mécanismes ou caractéristiques musculaires différents des échantillons dits « prédictibles » qui font l'objet d'analyses complémentaires.

Conclusion

Ce travail montre qu'à partir de l'abondance des 24 protéines nous sommes en mesure de prédire la tendreté d'environ 60 % des échantillons analysés pour chacun des muscles ST et LT. Nous confirmons ainsi le rôle important de certaines protéines dans la tendreté, et leur pertinence dans l'utilisation à terme pour un test pratique. Des analyses plus spécifiques sur le groupe d'échantillons dits « non prédictibles » sont en cours. D'autre part, d'autres approches mathématiques sont actuellement développées à partir des mêmes données afin d'établir une équation prédictive uniquement sur la base des protéines les plus explicatives de la tendreté.

Références bibliographiques

- Bernard, C., Cassar-Malek, I., LeCunff, M., Dubroeuq, H., Renand, G., Hocquette, J. F., 2007. J. Agric. Food Chem., 55, 5229-5237.
- Guillemin, N., Cassar-Malek, I., Hocquette, J. F., Jurie, C., Micol, D., Listrat, A., Levéziel, H., Renand, G., Picard, B., 2009a. INRA Prod. Anim., 22, 331-344.
- Guillemin, N., Meunier, B., Jurie, C., Cassar-Malek, I., Hocquette, J. F., Levéziel, H., Picard, B., 2009b. J. Physiol. Pharmacol., 60, 91-97.
- Hocquette, J. F., Laville, E., Bernard, C., Picard, B., Cassar-Malek, I., Sayd, T., Lepetit, J., Jurie, C., Meunier, B., Micol, D., Levéziel, H., Renand, G., 2008. 12èmes Journées des Sciences du Muscle et Technologies de la viande, Tours
- Jia, X., Veiseth-Kent, E., Grove, H., Kuziora, P., Aass, L., Hildrum, K. I., Hollung, K., 2009. J. Anim. Sci., 2391-2399.

Remerciements

Les auteurs remercient les Unités Expérimentales de Bourges et du Pin au Haras pour la fourniture des animaux de l'étude, l'Abattoir expérimental de Theix pour leur abattage et les prélèvements de muscles, Christiane Barboiron pour les extractions de protéines, et Jacques Lepetit[†] pour les mesures de WB.

Prediction equations of beef tenderness: implication of oxidative stress and apoptosis

MSc Nicolas Guillemin, Catherine Jurie, Didier Micol, Gilles Renand, Jean-François Hocquette*, Brigitte Picard

The French National Institute for Agricultural Research

Abstract (350 words)

Several studies have generated a list of potential protein markers of tenderness using two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry (for review Picard *et al.* 2010). This work has developed prediction equations of mechanical shear-force measures including the abundances of 24 potential protein markers for two muscles, *Longissimus Thoracis* (LT) and *Semitendinosus* (ST) independently. This work was done on 111 samples of each muscle, provided from Charolais young bulls and steers of the French MUGENE program (Genanimal-APISGENE). Protein marker abundances from total protein extraction were quantified by Dot-Blot, an immunological technique, using specific antibodies for each protein. Shear-force measures of the 222 samples were obtained with the Warner-Bratzler device. On both muscles, the tenderness prediction equations were obtained by multiple regression analysis of shear-force measures on protein abundances. The LT-muscle equation predicts toughness measures with an error of 5.7 % on 56 % of samples. Major expressed proteins are Heat Shock Protein 20 ($P < 0.0001$), Heat Shock Protein 70-GRP75 ($P < 0.05$), α B-Crystallin ($P < 0.05$) and cis-peroxiredoxin ($P = 0.001$). The ST-muscle equation predicts toughness measures with an error of 5.9 % on 57 % of samples. Major expressed proteins are cis-peroxiredoxin ($P < 0.0001$), Heat Shock Protein 40 ($P < 0.05$), Heat Shock Protein 70-GRP75 ($P < 0.05$) and Heat Shock Protein 70-1A ($P = 0.001$). All these proteins are involved in oxidative stress resistance, by anti-oxidant activity (such as cis-peroxiredoxin) or chaperoning activity (such as Heat Shock Proteins). The Heat Shock Proteins are also involved in apoptosis inhibition to protect cell integrity in case of oxidative stress. We demonstrated the importance of apoptosis and oxidative stress on meat tenderness predictability. In the two muscles LT and ST, oxidative stress has a negative effect on tenderness. In ST muscle, apoptosis has a positive effect on tenderness, but its implication in LT is still unclear. These results will be used in a first way to better understand tenderization processes, and in a second way for the conception of a protein array prediction test for industry. (335)

Picard *et al.* (2010). Skeletal muscle proteomics in livestock production. *Briefings in Functional Genomics*, **9**(3); 259-278.

Biography (200 words)

Jean-François Hocquette was born in France, in 1962. He graduated as an Engineer in Agronomy from the National Institute of Agronomy, Paris-Grignon in 1985 and received a PhD from the University of Paris XI in 1990 (specialty: endocrinology). Since 1991, JF Hocquette has been a research scientist at the National Institute of Agricultural Research, Animal Husbandry and Nutrition Department, Growth and Metabolism Unit. In 1999, he was appointed head of the "Muscle Growth and Metabolism" Group (5 scientists) of the Herbivore Research Unit in the same Institute. He is currently the Director of the Herbivore Research Unit (172 staff, <http://www1.clermont.inra.fr/urh/>). JF Hocquette's research interest mainly concerns muscle biology as relevant to beef quality. He has co-authored a patent for a genomic marker for meat tenderness and has been invited as the main speaker to more than fifteen conferences in international meetings. JF Hocquette is strongly involved in the activity of the Cattle Commission of the European Association for Animal Production. In 2005, he edited a book entitled "Indicators of milk and beef quality" (460 pages, 20 review papers), EAAP Publication No. 112. He is also a member of the French Meat Academy.

Analyse de marqueurs de tendreté de la viande bovine : étude de fonctionnalité des gènes et analyse des polymorphismes

Nicolas GUILLEMIN^{1,2}, Hubert LÉVEZIEL², Brigitte PICARD¹

1 : Unité de Recherche sur les Herbivores, UR1213 INRA, Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France.

2 : Unité de Génétique Moléculaire Animale, UMR1061 INRA-Université de Limoges, Faculté des Sciences et Techniques, 87060 Limoges Cedex, France.

La problématique

Insatisfaction des consommateurs pour la **tendreté**, critère d'appréciation **principal** de la viande



En cause : la grande **variabilité** de la tendreté

La raison : la tendreté est dépendante de **multiples facteurs** (muscles, races, conduites d'élevage...)

Le problème : cette variabilité de la tendreté n'est **pas maîtrisée** par la filière viande bovine



Nécessité d'apporter des outils de prédiction du potentiel de tendreté d'un animal à la filière



Comment y répondre : objectifs de la thèse

Liste de **marqueurs** biologiques (Gènes, ARNm, Protéines) corrélés à la tendreté établie lors d'études antérieures par analyses génomiques (transcriptomique, protéomique) et dans des **contextes de production spécifique**.

Validation de cette liste dans différents **contextes de production français**

• *Génomique fonctionnelle (Western blot / RT-PCR)*

Analyse des **polymorphismes** des gènes de ces marqueurs

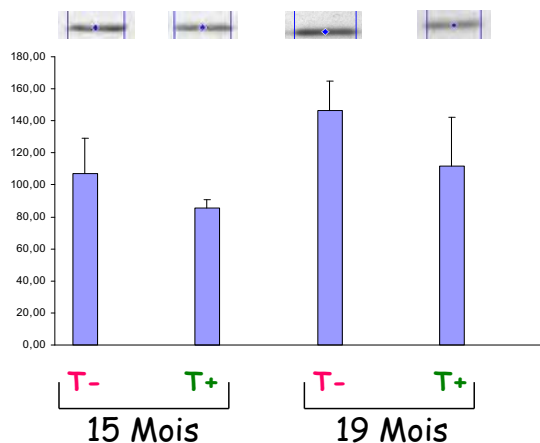
Compréhension des fonctions biologiques de ces marqueurs dans la cellule musculaire

• *Réalisation d'une carte d'interaction protéique grâce aux outils bioinformatiques*

Développer un test commercial de prédiction du potentiel de tendreté à destination de la filière viande bovine française

Premiers résultats

Validation par **Western Blot et densitométrie** d'une protéine du stress, **Hsp27**, sur des taurillons de race Charolaise âgés de 15 et 19 mois (muscle *Longissimus Thoracis*) de **tendreté inférieure (T-)**, note moyenne = 3,39) et **supérieure (T+)**, note moyenne = 6,45) évaluée par un **jury** d'analyse sensorielle



• Hsp27 corrélée négativement à la tendreté aux deux âges : **confirmation** des études précédentes au niveau des ARNm
• **Marqueur retenu** pour les études de polymorphisme génétique



Perspectives

- Poursuite des validations sur une **vingtaine de marqueurs biologiques** par génomique fonctionnelle dans **divers contextes** d'animaux et de production (4 races, 2 types de muscle, 4 types d'animaux et différentes conduites d'élevage).
- **Sélection** de 3 à 4 marqueurs **les plus pertinents** pour la recherche de **polymorphisme**.

Analyse approfondie de marqueurs de qualité sensorielle de la viande bovine



Nicolas GUILLEMIN^{1,2}, Brigitte PICARD¹, Hubert LEVEZIEL².

1 : Unité de Recherches sur les Herbivores, UR1213 INRA , Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France.

2 : Unité de Génétique Moléculaire Animale, UMR1061 INRA-Université de Limoges, Faculté des Sciences et Techniques, 87060 Limoges Cedex, France.

Contexte

- La **tendreté** de la viande bovine : qualité sensorielle **très importante** pour le consommateur (source d'insatisfaction dans un secteur soumis à de fortes pressions).
- Mais caractéristique **multifactorielle** non totalement expliquée, sujette à une **grande variabilité**.

Races, animaux, type de muscles, facteurs de production...

Fibres Collagène Lipides Protéases



Dureté importante



Tendreté de la viande



Tendreté importante

→ Nécessité d'améliorer la filière bovine française pour assurer une **qualité optimale du produit**

→ Identification et **sélection** des meilleurs animaux producteurs d'une viande tendre pour **une amélioration génétique des races à viande**.

Objectif

1. Valider des marqueurs biologiques de la tendreté sur des échantillons de différents types d'animaux (vaches, bœufs, taurillons), de races (Blonde d'Aquitaine, Charolaise, Limousine, Salers), et de muscles (*Semitendinosus*, *Longissimus thoracis*).

2. Trouver des polymorphismes dans les gènes de certains de ces marqueurs qui soient commercialement exploitables afin d'aboutir à un **test de tendreté**.

3. Mieux comprendre les mécanismes de la tendreté pour optimiser les méthodes de production d'une **viande de tendreté maîtrisée**.

Approche

• Établissement d'une liste de **marqueurs d'intérêt** identifiés par génomique fonctionnelle notamment lors du programme MUGENE et de thèses de l'URH (Julien Bouley 2004, Carine Bernard 2007).

• Validation des marqueurs d'intérêt par des **techniques de Western Blot** et/ou RT-PCR à l'URH. Étude des **polymorphismes des gènes** (SNPs, micro-satellites...) effectuée à l'UGMA.

Financement

50 % INRA (dont 50% Département PHASE et 50% Génétique Animale) 50% Région Auvergne

Parcours

Licence Biologie Moléculaire à Limoges (2005).

Master Recherche de Biologie moléculaire, structurale et cellulaire à Nancy I (2007).

Projet professionnel

Effectuer un post-doc dans le domaine de la viande bovine à l'étranger et poursuivre dans ce sujet.

10^{ème} Séminaire des thésards du Département de Génétique Animale • Toulouse, 20 & 21 mars 2008 •



Validation de marqueurs protéiques de la tendreté de la viande bovine : choix méthodologiques

GUILLEMIN N., MEUNIER B., LEVEZIEL H.⁽¹⁾, G. RENAND⁽²⁾, J. LEPETIT⁽³⁾,
HOCQUETTE J-F., PICARD B.

Unité de Recherches sur les Herbivores, INRA UR1213, 63122 Saint-Genès-Champanelle
(1) Unité de Génétique Moléculaire Animale, INRA-Université de Limoges UMR1061, 87063 Cedex
(2) Station de Génétique Quantitative et Appliquée, INRA UR337, 78352 Jouy-en-Josas
(3) Unité Qualité des Produits Animaux, INRA UR370, 63122 Saint-Genès-Champanelle



La tendreté : un chaos musculaire

Dépend des caractéristiques du muscle (protéines, collagène...), tissu très complexe influencé par la vie de l'animal et sa génétique

La tendreté est donc très variable entre :

Systèmes de production
Races bovines
Type d'animal
Individus et muscles

Non maîtrisée par la filière :
insatisfaction des consommateurs de viande bovine



La filière viande bovine nécessite un test de prédiction de la tendreté

Des éléments de réponse

Diverses études dans des contextes spécifiques ont révélé des marqueurs potentiels de la tendreté (DNAJA1, MLC-1F, PGM, Hsp27...) par analyses protéomiques, transcriptomiques et génomiques (programmes MUGENE, QUALVIGENE...)

Objectif de la thèse : valider des marqueurs protéiques dans différents contextes de la filière française (races, type d'animal, muscles...)

Nécessité de disposer d'un outil d'analyse fiable et à haut débit

Comparaison des techniques

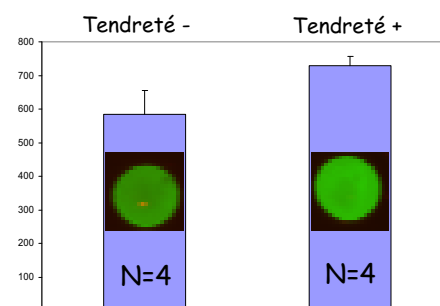
Utilisation d'anticorps spécifiques de la protéine recherchée en :

- Western Blot : séparation électrophorétique des protéines selon leur masse, puis transfert sur une membrane. Analyse simultanée de 10 échantillons / manip.
- Dot Blot : fixation des protéines directement sur une membrane sans séparation au préalable. Analyse simultanée de 96 échantillons / manip.

	Western Blot		Dot Blot
Révélation par :	Chémiluminescence	Fluorescence	Fluorescence
Individus	N=8	N=8	N=8
Répétitions par Individu	R=4	R=2	R=6
CV technique	45%	9%	10%
	Peu fiable Bas débit	Fiable Bas débit	Fiable Haut débit

Mise en application

Analyse par Dot Blot de la phosphoglucomutase dans le muscle *Semitendinosus* de taurillons Charolais de tendreté différente



Corrélation PGM/Tendreté : +0.84 (P<0.0083)

Validation du marqueur potentiel

Conclusion : la technique de Dot Blot protéique en fluorescence validée dans cette étude qui permet des analyses fiables et à haut débit est retenue pour la validation de marqueurs protéiques de la tendreté de la viande



Unité de Recherches sur les Herbivores

Institut National de la Recherche Agronomique



Validation d'un marqueur potentiel de la tendreté de la viande bovine



GUILLEMIN N. (1,2), LEVEZIEL H. (2), RENAND G. (3), MICOL D. (1), HOCQUETTE J-F. (1), PICARD B. (1)

(1) INRA, UR1213, Unité de Recherches sur les Herbivores, Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France

(2) INRA-Université de Limoges, UMR1061, Unité de Génétique Moléculaire Animale, 123 avenue Albert Thomas, 87060 Limoges Cedex, France

(3) INRA, UR337, Station de Génétique Quantitative et Appliquée, 78352 Jouy-en-Josas, France



La tendreté de la viande



Qualité sensorielle très variable / Critère majeur d'appréciation des consommateurs

Filière viande bovine demandeuse de tests de prédiction de la tendreté

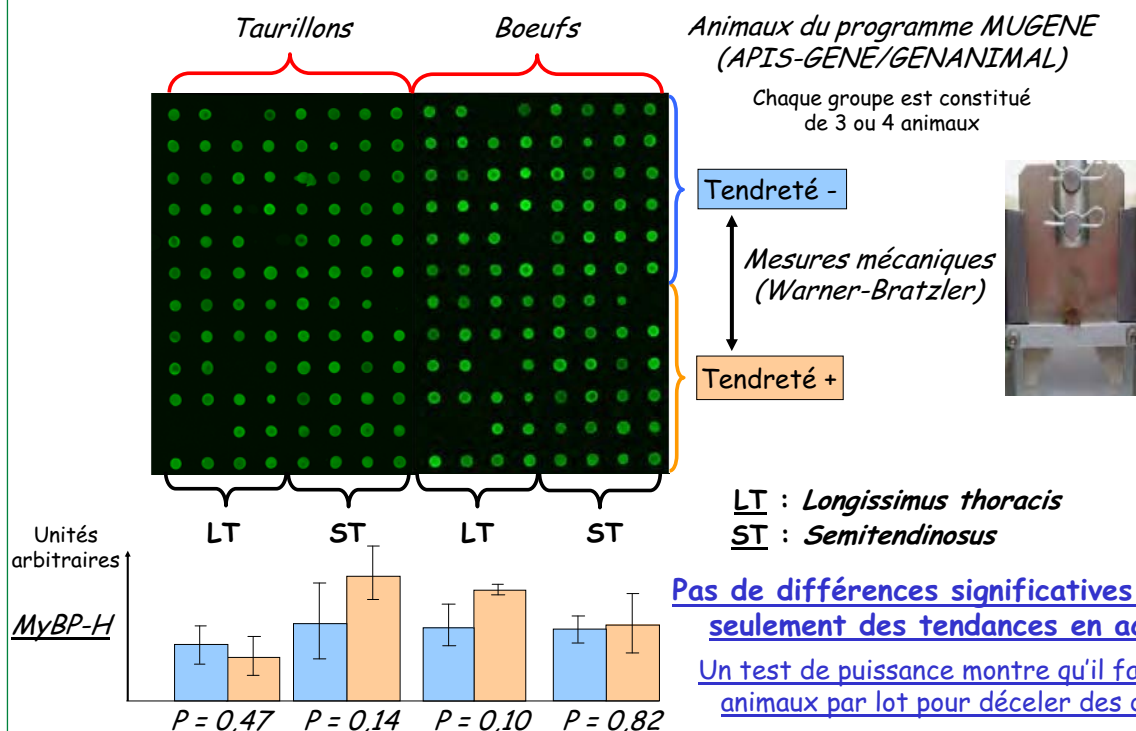
La génomique fonctionnelle a révélé des marqueurs protéiques potentiels de la tendreté (Bouley *et al*, 2004)

Objectif : validation des marqueurs potentiels - exemple de la protéine MyBP-H*

Plus exprimée dans le muscle ST de taurillons de tendreté supérieure d'après analyse protéomique

Quantification de la protéine MyBP-H par Dot-Blot

Dot-Blot : technique de quantification de protéines permettant l'analyse simultanée d'un grand nombre d'échantillons (Guillemin *et al*, 2009)



Pas de différences significatives observées entre les lots, seulement des tendances en accord avec Bouley *et al*

Un test de puissance montre qu'il faudrait analyser au moins 36 animaux par lot pour déceler des différences significatives.

En conclusion...

L'influence d'un marqueur potentiel sur la tendreté, illustrée par l'exemple de la MyBP-H et confirmée par l'analyse d'autres marqueurs, est dépendante des différences entre muscles et types d'animaux.

➔ Nécessité de développer des tests de prédiction basés sur plusieurs marqueurs liés à la tendreté dans différents muscles et types d'animaux.

➔ Mise au point d'une équation prédictive de la note de tendreté en fonction des quantités de marqueurs dans des contextes muscles, types d'animaux et races précis.

* Myosin Binding Protein-H



Effect of muscle and animal types on the expression of HSPs in cattle muscle

GUILLEMIN N. (1), JURIE C. (1), HOCQUETTE J-F. (1), LEVEZIEL H. (2), PICARD B. (1)

(1) INRA, UR1213 Herbivores, Site de Theix, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

(2) INRA-Université de Limoges, UMR1061 Génétique Moléculaire Animale, F-87060 Limoges, France

Study context



Beef tenderness →

First interest for consumers (and so producers !)
But with large variability

Heat Shock Proteins (HSPs) are potential tenderness biological markers

How are they expressed among different muscles and animal types ?

Charolais breed



Young bulls



Steers

Longissimus Thoracis (N=29)

LT, fast oxydo-glycolytic

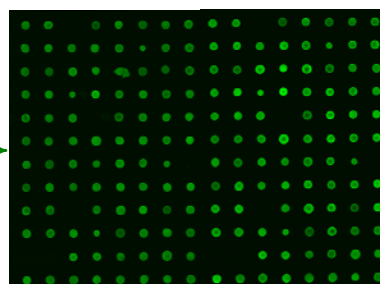
Semitendinosus (N=29)

ST, glycolytic

Longissimus Thoracis (N=23)

Semitendinosus (N=23)

Methods of investigation



For each HSP

αB-crystallin *Hsp40*
Hsp20 *Hsp70-1A*
Hsp27 *Hsp70-8*

Specific protein quantification by Dot-Blot
(Guillemin *et al*, 2009)

Muscle and animal type effects on HSPs expression

Young bulls vs Steers
(quantities in arbitrary units)

16.4 vs 10.6

● *αB-crystallin* ●

16.2 vs 11.3

● *Hsp20* ●

11.7 vs 5.9

● *Hsp27*

Hsp40 ●

Hsp70-1A ●

15.1 vs 16.7

● *Hsp70-8* ●

Animal type effect
● : $P < 0.05$

HSPs are more expressed in
young bulls than steers
(excepted for Hsp70-8)

LT vs ST
(quantities in arbitrary units)

17.8 vs 9.2

16.9 vs 10.7

16.4 vs 13.5

17.8 vs 11

16.5 vs 15.4

Muscle type effect
● : $P < 0.05$

HSPs are more expressed in
LT than ST muscle



The muscle effect on proteins expression is more evident than animal type effect

The HSPs (induced by thermal and oxidative stress) are more expressed in an androgenic (young bull vs steers) and/or oxidative metabolism (LT vs ST) context

Conclusion



Different beef production systems influence the expression of some potential beef tenderness markers

This type of fundamental knowledge is important for managing beef tenderness

Thanks for reading !





Mise en équation de la tendreté de la viande bovine à partir de validations de marqueurs potentiels



GUILLEMIN N., JURIE C., RENAND G. (1), HOCQUETTE J-F., LEPETIT J. (2), LEVEZIEL H. (3), PICARD B.

INRA, UR1213, Unité de Recherches sur les Herbivores, Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France

(1) INRA, UR337, Station de Génétique Quantitative et Appliquée, 78352 Jouy-en-Josas, France

(2) INRA, UR370, Qualité des Produits Animaux, Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France

(3) INRA-Université de Limoges, UMR1061, Unité de Génétique Moléculaire Animale, 123 avenue Albert Thomas, 87060 Limoges Cedex, France

La tendreté de la viande bovine



Caractère complexe et multifactoriel, source d'insatisfaction des consommateurs

Divers programmes de génomique fonctionnelle ont identifié des marqueurs potentiels de la tendreté (Protéines, ARN, ADN)

Objectif : établissement d'équations de prédiction de la tendreté à partir de quantifications de marqueurs biologiques choisis, au niveau protéine

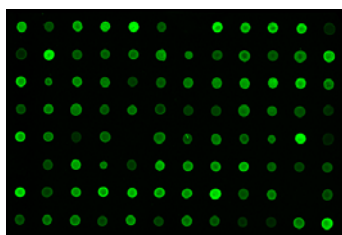
Application pour la filière : mise au point d'un test immunologique de prédiction de la tendreté



Méthodologie

24 protéines étudiées sont quantifiées sur différents muscles / types d'animaux par Dot-Blot, technique immunologique mise au point spécifiquement pour cette étude, à l'aide d'anticorps spécifiques (Guillemin *et al*, 2009).

Programme MUGENE Genanimal-AGENAE 2003



Exemple de Dot-Blot pour un marqueur (anticorps spécifique)

28 taurillons Charolais

23 bœufs Charolais

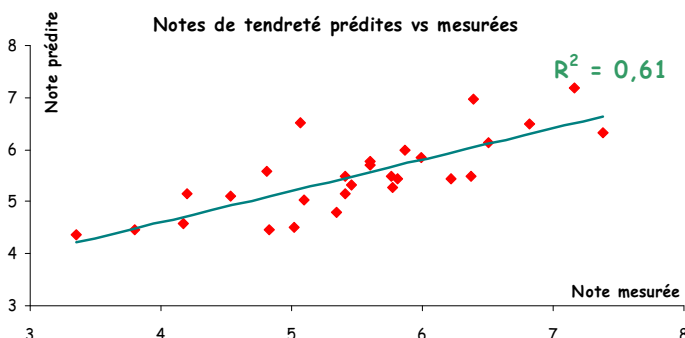
Pour chaque animal

Muscle *Longissimus Thoracis* (LT)
Entrecôte, bonne tendreté
Muscle *Semitendinosus* (ST)
Rond-de-gîte, tendreté moyenne

Les données de ces phénotypes sont mises en équation par une régression multiple pas-à-pas avec les notes de tendreté (sensorielle/jury et mécanique/Warner-Bratzler) disponibles pour ces échantillons, pour chacun des contextes

Résultats : exemple du LT de taurillons (tendreté sensorielle)

$$\text{Tendreté sensorielle prédite} = C + a (\text{CapZ-}\beta) + b (\text{Malate Déshydrogénase 1}) + c (\text{MyHCII}) + \epsilon$$



Ce modèle permet de prédire la tendreté avec une fiabilité de 61%

Conclusion



D'autres modèles ont été établis sur d'autres muscles et types d'animaux. Les équations seront validées sur un autre ensemble d'animaux (programme MUGENE, année 2005)

Ce travail constitue une étape importante pour le développement de tests de prédiction de la tendreté à destination de la filière

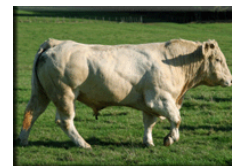


Vers la mise au point d'équation de prédictions de la tendreté de la viande bovine



GUILLEMIN N.⁽¹⁾, JURIE C.⁽¹⁾, MICOL D.⁽¹⁾, RENAND G.⁽²⁾, HOCQUETTE J-F.⁽¹⁾, PICARD B.⁽¹⁾.

(1) Unité de Recherches sur les Herbivores, INRA UR1213, 63122 Saint-Genès-Champagnelle
(2) Station de Génétique Quantitative et Appliquée, INRA UR337, 78352 Jouy-en-Josas



La tendreté de la viande bovine



Critère important d'appréciation par le consommateur - Présente une **forte variabilité non maîtrisée** par la filière

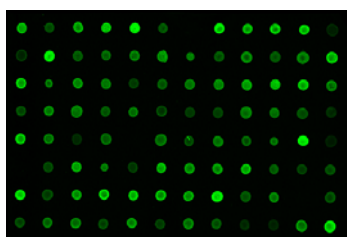
Sous l'impulsion de la filière viande bovine, divers programmes de **génomique fonctionnelle** ont identifié des **marqueurs potentiels** de la tendreté (Protéines, ARN, ADN).

La filière viande bovine est demandeuse de **tests immunologiques** de prédiction de la tendreté, sur l'animal vivant et sur la carcasse.

Objectif de l'étude : établissement d'équations de prédiction de la tendreté sur deux muscles à partir des quantifications de marqueurs protéiques identifiés dans différentes expérimentations

Méthodologie

24 protéines ont été quantifiées par Dot-Blot, technique immunologique mise au point pour cette étude, à l'aide d'anticorps spécifiques (Guillemin *et al*, 2009).



Exemple de Dot-Blot pour un marqueur (anticorps spécifique)

Programme MUGENE Genanimal-AGENAE 2003 et 2005

67 taurillons Charolais

44 bœufs Charolais

Pour chaque animal

Muscle *Longissimus Thoracis* (LT)

Entrecôte, bonne tendreté

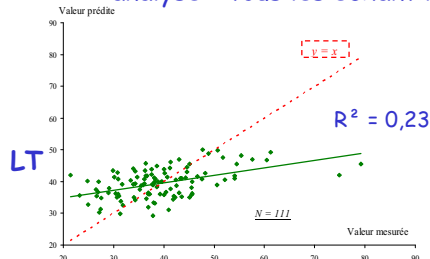
Muscle *Semitendinosus* (ST)

Rond-de-gîte, tendreté moyenne

Des **régressions linéaires** ont été effectuées entre les mesures de Warner-Bratzler des échantillons de viande (variables dépendantes à expliquer) et les abondances des 24 protéines dans les échantillons de muscles (variables quantitatives explicatives)

Résultats : des équations prédictives acceptables sur 2/3 des échantillons

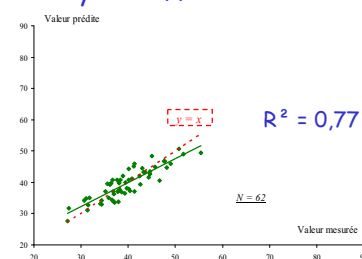
1^{ère} analyse - tous les échantillons



Des échantillons échappent totalement à cette équation : ils sont dits **imprédictibles**

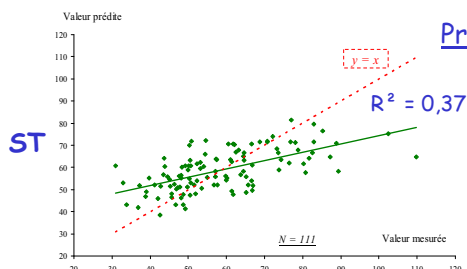
Protéine importante :
PRDX6

2^{ème} analyse - effectuée sur les échantillons prédictibles



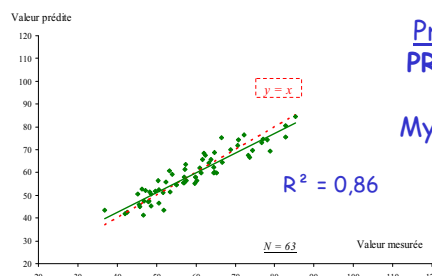
Cette régression permet d'affiner la **prédiction** de la tendreté pour les échantillons dits **prédictibles**

Protéines importantes :
MyBP-H (structure)
Hsp20 (stress oxydant)
PRDX6 (stress oxydant)
Myosine IIX (contraction)
α-crystalline (stress oxydant)



Protéines importantes :
PRDX6
LDHB

Conclusion



Protéines importantes :
PRDX6 (stress oxydant)
LDHB (métabolisme)
Myosine IIX (contraction)
Hsp40 (chaperonne)

Cette approche a permis de développer, à partir des 24 marqueurs analysés, des **équations de prédiction de la tendreté acceptables** sur une majorité des échantillons de la population. Une analyse plus approfondie des échantillons dits imprédictibles est en cours pour comprendre les différences de tendreté

Les équations de prédiction vont être **testées sur d'autres populations** (races / types d'animal)

PRDX6 est un **bon marqueur** de tendreté, montrant l'importance du **stress oxydant**

Les anticorps peuvent être utilisés dans des **tests** de prédiction.

Unité de Recherches sur les Herbivores



Script sous R de calcul de coefficients de corrélation avec la P-value associée

#Auteur : Léonard Cynthia

#Finalité : Corrélations de Pearson

#Date de création : 23/06/09

positionnement de R dans le répertoire adéquat
setwd("X:/Répertoire de travail/")

```
#####  
#  
# Déclaration de fonctions #  
#####  
#
```

calcul du pourcentage de NA dans un tableau donné

```
pourcentNA = function(tab)  
{  
  i = compteur = pourcNA = 0  
  for(i in 1:ncol(tab))  
  {  
    j = 0  
    for(j in 1:nrow(tab))  
      if(is.na(tab[j,i]) == TRUE)  
        compteur = compteur + 1  
  }  
  pourcNA = round(((compteur * 100) / (i * j)), digits = 6)  
  names(pourcNA) = "Pourcentage de NA trouvé :"  
  return(pourcNA)  
}
```

chargement des données

```
chargerDon = function(choix, donVar)  
{  
  if(choix == 1)  
  {  
    donLog = donVar[,1:nbFac]  
    donLog = cbind(donLog, log2(donVar[(nbFac+1):ncol(donVar)]))  
    donVar = donLog  
  } else  
    donVar = donVar  
  return(donVar)  
}
```

Choix d'une modalité

```
newMat = function(facteur, modalites, mod, donnees)  
{  
  i = j = 0  
  for(j in 1:nrow(donnees))  
  {
```

```

        if(donnees[j,facteur] == modalites[mod])
        {
            newMat = donnees[j,]
            break
        }
    }
    for(i in (j+1):nrow(donnees))
    {
        if(donnees[i,facteur] == modalites[mod])
        {
            newMat = rbind(newMat, donnees[i,])
        }
    }
    return(newMat)
}

#####
#
#      Importation et construction de la matrice de travail      #
#####
#

# importation du fichier dont on veut réaliser l'ACP dans la donVar "matBrute"
tMatBrute = read.table("Fichier de données.csv",
                      sep = ";", dec = ".",
                      header = TRUE, row.names = 1,
                      na.strings = ".")

tMatBrute

# récupération des noms de lignes et de colonnes
nomLig = rownames(tMatBrute)
nomCol = colnames(tMatBrute)

# choix des facteurs par l'utilisateur
print("Combien de facteurs allez-vous utiliser ?")
nbFac = scan("", nmax = 1)
names(nbFac) = "Nombre de facteur(s) :"
nbFac

# calcul du nombre de variables (colonnes - facteurs)
nbVar = ncol(tMatBrute) - nbFac
names(nbVar) = "Nombre de variables trouvées :"
nbVar

# calcul du nombre d'individus (lignes)
nbInd = nrow(tMatBrute)
names(nbInd) = "Nombre d'individus trouvés :"
nbInd

```

```
#####
#          Création du tableau de travail          #
#####

# conversion des données "factor" en données "numeric"
donVar = data.frame(tMatBrute[,1], row.names = nomLig)
i = 1
for(i in 2:nbFac)
{
    donVar = cbind(donVar, tMatBrute[,i])
}
for(i in (nbFac+1):ncol(tMatBrute))
{
    donVar = cbind(donVar, as.numeric(tMatBrute[,i]))
}
colnames(donVar) = nomCol

# calcul du pourcentage de NA
pourcentNA(donVar[(nbFac+1):ncol(donVar)])

##### pour les individus

# transposition de la matrice
matBrute = t(tMatBrute)

# conversion des données "factor" en données "numeric"
matBrutInd = matBrute[(nbFac+1):nrow(matBrute),]
donInd = data.frame(as.numeric(as.character(matBrutInd[,1])),
                    row.names = nomCol[(nbFac+1):nrow(matBrute)])
i = 1
for(i in 2:ncol(matBrutInd))
{
    donInd = cbind(donInd, as.numeric(as.character(matBrutInd[,i])))
}
colnames(donInd) = nomLig

# calcul du pourcentage de NA
pourcentNA(donInd)

#####
#          Correlation          #
#####
# correlation avec p-value
library(Hmisc)
matCor = rcorr(as.matrix(donVar[(nbFac+1):ncol(donVar)], type = "pearson"))
matCor

library(FactoMineR)
write.infile(matCor, file = "matCor.csv",
            sep = ";")
```

Abstract

The uncontrolled variability of beef tenderness is a major problem for industry. This quality is very important for consumers. For many years, different research programs have identified DNA, RNA and proteins markers of beef tenderness, in different contexts. In United States and Australia, these tests reached to the conception of efficient meat quality prediction tests. However, these tests do not work in France. So, French industry asks for simple tenderness prediction tests, which measure tenderness on living animals and carcasses. This type of tests is currently missing.

The objective of the PhD is to validate or not a list of proteins tenderness potential markers, and to develop quality prediction equation, to engage the conception of immunological tests for industry, usable on living animals and carcasses.

A new technique for quantify proteins in bovine muscle samples have been developed, the Dot-Blot, and allow to have prototypes of the future tenderness tests. Utilization of Dot-Blot provides phenotypic data of 224 proteins on 111 muscle samples of Charolais beefs and young bulls.

This work first identified biological effects due to animal and muscle types on proteins abundance. Then, three different analyses, with corroborating results, validated tenderness markers and revealed main cellular pathways implied in tenderness, and generated tenderness prediction equations.

Bioinformatics tools have been built upon experimental data from this work on tenderness proteins and human databases, to better understand the main mechanisms implied in tenderization processes.

In conclusion, this work have developed a new analyzing tool and the first beef tenderness prediction equation, trusty on a male-based system, essential supports for the development of beef tenderness prediction tests on living animals and carcasses. Moreover, this work enabled to better understand and characterize the molecular mechanisms involved in tenderization processes.

Key-words: Bovine Meat, Equations of prediction, Interactome, Proteomics, Tenderness

Résumé

La variabilité non maîtrisée de la tendreté de la viande bovine est un problème majeur pour la filière industrielle, cette qualité étant très recherchée par les consommateurs. Depuis de nombreuses années, différents programmes de recherche ont identifié des marqueurs ADN, ARN et protéines de la tendreté de la viande bovine, dans des contextes différents. Aux Etats-Unis et en Australie, des recherches ont abouti à la conception de tests efficaces de prédiction de la qualité de la viande. Ces tests ne fonctionnent cependant pas sur les élevages français. La filière française est donc demandeuse de tests de prédiction simples permettant de mesurer la tendreté sur l'animal vivant et la carcasse. De tels tests sont inexistants à l'heure actuelle.

L'objectif de la thèse est de valider ou non une liste de potentiels marqueurs protéiques de la tendreté, et de développer des équations de prédiction de cette qualité, afin d'envisager la conception de tests immunologiques de prédiction à destination de la filière sur l'animal vivant et la carcasse, dans un avenir proche.

Une nouvelle technique pour quantifier les protéines d'un échantillon de muscle bovin a été développée, le Dot-Blot, et permet de disposer de prototype pour de futurs tests de phénotypage de la tendreté. L'utilisation de cette technique a permis de quantifier 24 protéines sur 111 échantillons de deux muscles de bœufs et de taurillons de race Charolaise.

Ces travaux ont identifié en premier lieu des effets biologiques liés au type de muscle et d'animal sur l'abondance des protéines. Puis, trois analyses différentes, dont les résultats sont concordants, ont validé des marqueurs de tendreté et mis en lumière les principaux mécanismes cellulaires impliqués dans la tendreté, générant des équations de prédiction de la tendreté. Des outils de bioinformatique ont été construits à partir de données expérimentales de la thèse sur les protéines de la tendreté et de bases de données humaines, afin de mieux comprendre les mécanismes biologiques impliqués dans la mise en place de la tendreté.

En conclusion, ce travail de thèse a développé un nouvel outil d'analyse et les premières équations de prédiction de la tendreté de la viande bovine fiables sur un système centré sur les mâles, supports indispensables au développement de tests de prédiction de la tendreté sur l'animal vivant et la carcasse. De plus, ce travail a permis de mieux comprendre et caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans la mise en place de la tendreté.

Mots-clé : Equations de prédiction, Interactome, Protéomique, Tendreté, Viande bovine