



**HAL**  
open science

# Caractérisation des effets de la mutation "culard" en race ovine Texel belge sur le protéome sarcoplasmique

Muriel Hamelin

► **To cite this version:**

Muriel Hamelin. Caractérisation des effets de la mutation "culard" en race ovine Texel belge sur le protéome sarcoplasmique. Biologie animale. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II; Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2006. Français. NNT : 2006CLF21680 . tel-00703080

**HAL Id: tel-00703080**

**<https://theses.hal.science/tel-00703080>**

Submitted on 31 May 2012

**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.

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

## THESE

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

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité: Nutrition et Sciences des Aliments

Soutenue le 13 octobre 2006

Muriel HAMELIN

*Caractérisation des effets de la mutation "Culard" en  
race ovine Texel Belge sur le protéome sarcoplasmique.*

Thèse encadrée par le Dr. Elisabeth Laville

### JURY

Président:	Mr	P. MICHAUD	Membres:	Mme	B. PICARD
				Mr	J.P. RENOUE
Rapporteurs:	Mr	A. CLINQUART		Mme	E. LAVILLE
	Mr	A. MAFTAH			

INRA – Unité de Recherche Qualité des Produits Animaux (QuaPA)  
Equipe Biochimie des Protéines du Muscles (BPM)  
Centre de Recherches de Clermont-Ferrand/Theix 63122 St-Genès Champanelle

*"Lorsque les sciences dévoilent les secrets de la nature, ce que celle-ci perd de mystérieux, elle le gagne en merveilleux."*

Paul Carvel in "Mots de tête".

## REMERCIEMENTS

Cette thèse a bénéficié d'un cofinancement des départements CEPIA (Caractérisation et Elaboration des Produits Issus de l'Agriculture) et SAGA (Station d'Amélioration Génétique des Animaux) de l'INRA et de la région Auvergne.

J'ai été accueillie dans l'unité de recherche sur la viande (URV) dirigée par J. Culioli devenue par la suite l'unité Qualité des Produits Animaux (QuaPA) dirigée par JP Renou, j'ai travaillé au sein de l'équipe BPM initialement dirigée par G. Monin que je tiens à remercier pour son accueil.

Je suis reconnaissante à Messieurs Clinquart et Maftah pour m'avoir fait l'honneur d'être mes rapporteurs ainsi qu'à Mr Renou et à Mme Picard d'avoir acceptés de participer au jury de cette thèse. Enfin je remercie Mr Michaud d'avoir endossé la lourde tâche de président du jury.

Je souhaite remercier E. Laville pour m'avoir encadrée avec rigueur et esprit critique au cours de ces trois ans et demi.

Et je la remercie aussi pour m'avoir soutenue face à l'invasion du patois auvergnat! Je le dis et je le répète: "Ca te magne!" et "s'être fait fâcher" ne sont pas des expressions françaises! Je remercie donc tous les stagiaires de l'équipe pour m'avoir fait découvrir l'utilisation du "Y" et quelques expressions pas piquées des hannetons, merci à Véro (J.), Aurélie, Alban, Anthony, JérômeS (au pluriel!), Sibille, Ilham, Steph, Léo, Caroline, Carlos, Suzanna, Isabelle et à tous ceux qui sont passés et ont contribué à la bonne ambiance de cette équipe et à l'accroissement de ma culture générale!

Un grand Merci à Thierry pour m'avoir appris les techniques de protéomique IEF, 2D et j'en passe, et merci à Christophe pour m'avoir aidé à identifier ces quelques taches qui traînaient sur mes gels!

Je remercie également tous ceux qui bien que restés en région parisienne m'ont soutenue et m'ont encouragée.

Pour finir, merci Mattou, merci papa, merci ma Kiki sans vous et votre soutien indéfectible je n'en serais pas là aujourd'hui.

Mais non, Maudite, je ne t'ais pas oubliée, merci pour m'avoir supportée ces derniers mois et tout au long de cette thèse.

# TABLE DES MATIERES

<b>Tableaux</b> .....	<b>4</b>
<b>Figures</b> .....	<b>5</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>6</b>
<b>Partie I. Présentation.</b>	
<b>Chapitre I. Généralités Biologiques</b> .....	<b>8</b>
I. Structure et organisation du Tissu Musculaire .....	8
I.1. Le muscle squelettique: Structure et organisation .....	8
I.1.a. Les cellules satellites .....	9
I.1.b. Les vaisseaux sanguins et les nerfs .....	10
I.1.c. Les fibroblastes.....	10
I.1.d. La fibre musculaire .....	11
I.1.e. Structure de la myofibrille.....	12
I.2. Mécanistique de la contraction musculaire .....	14
I.2.a. Actine et Myosine : base de la contraction musculaire.....	14
I.2.b. Stabilisation du complexe actine-myosine .....	14
I.2.c. Relaxation musculaire.....	15
II. Métabolisme musculaire.....	16
II.1. Les sources d'énergie pour la contraction.....	16
II.1.a. La glycolyse .....	18
II.1.b. Glycolyse anaérobie.....	18
II.1.c. Métabolisme oxydatif et phosphorylation oxydative.....	19
II.1.d. Métabolisme lipidique: la $\beta$ -oxydation.....	20
II.2. Métabolisme et stress oxydatif .....	20
II.3. Recyclage des protéines .....	22
III. Types de fibres et développement musculaire.....	23
III.1. Les types de fibres musculaires et les différents types musculaires.....	23
III.2. Développement du muscle.....	25
III.3. L'hypertrophie .....	26
III.3.a. Le modèle Callipyge.....	27
III.3.b. La mutation Carwell.....	27
III.3.c. Le modèle "Texel Belge" .....	27
III.4. La Myostatine.....	29

<b>Chapitre II. Méthodes d'études du protéome et du transcriptome. ....</b>	<b>31</b>
I. Le protéome .....	31
I.1. L'électrophorèse bi-dimensionnelle .....	31
I.1.a. Première dimension ou iso-électro-focalisation .....	32
I.1.b. Deuxième dimension ou électrophorèse en gel de Polyacrylamide dénaturante (SDS-PAGE) .....	32
I.1.c. Les limites de l'électrophorèse 2D.....	34
I.2. L'extraction fractionnée .....	34
I.3. Visualisation des protéines .....	35
I.4. Spectrométrie de masse et Identification protéique.....	36
I.5. Technique de SELDI-TOF.....	37
II. Le transcriptome .....	39
II.1. La transcription inverse .....	39
II.2. Amplification PCR-temps réel .....	40
II.3. Gènes rapporteurs et méthodes de comparaison .....	42
<b>Chapitre III. Matériel et méthodes.....</b>	<b>43</b>
I. Matériel : .....	43
I.1. Animaux.....	43
II. Méthodes .....	45
II.1. Histologie .....	45
II.2. Protéome .....	45
II.2.a. Extraction fractionnée .....	45
II.2.b. Electrophorèse bidimensionnelle .....	46
II.2.c. Visualisation des protéines.....	46
II.2.d. Analyse d'image .....	46
II.2.e. Statistiques .....	47
II.2.f. Spectrométrie de masse et Identification protéique.....	47
II.2.g. Technique de SELDI-TOF .....	48
II.3. Expression génique .....	48
II.3.a. Extraction des ARN totaux.....	48
II.3.b. Transcription inverse .....	49
II.3.c. Amplification PCR-temps réel .....	49
II.3.d. Statistiques.....	50

## **Partie II. Résultats & Discussions.**

### **Chapitre I. Différences intermusculaires de l'expression des protéines.... 51**

I. Expression des protéines sarcoplasmiques de quatre muscles ovins. ....	51
Introduction .....	51
Résumé .....	52
Conclusions de l'article .....	53

### **Chapitre II. Effet du génotype Texel sur le protéome musculaire..... 55**

I. L'effet du génotype "Texel" sur les différences intermusculaires .....	55
Métabolisme glycolytique .....	55
Métabolisme oxydatif.....	55
Protéines associées à l'appareil contractile.....	56
Protéines associées au métabolisme oxydatif .....	56
Synthèse protéique .....	56
Conclusions .....	56
II. Effet du génotype Texel sur chacun des muscles: <i>Proteomic analysis of ovine muscle hypertrophy</i> .....	62
Introduction.....	62
Résumé.....	63
Conclusions de l'article.....	64
III. L'effet du génotype Texel sur l'ensemble des quatre muscles.....	65
IV. Conclusions.....	67
V. Analyse complémentaire: La technique SELDI-TOF .....	68
Résultats .....	68
Discussions.....	69

### **Chapitre III. Etude du transcriptome ..... 71**

Introduction .....	71
Extractions et amplifications .....	72
Résultats & Discussion .....	75
Différences intergénotype dans le muscle foetal.....	75
Différences intergénotypes dans le Vastus medialis .....	76
Différences intergénotypes dans le Semimembranosus.....	76
Comparaison des différents muscles .....	77
Conclusions.....	78

### **Chapitre IV. Conclusions & Perspectives..... 80**

<b>REFERENCES .....</b>	<b>84</b>
<b>Publications &amp; Présentations.....</b>	<b>90</b>
LEXIQUE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS.....	<b>91</b>
ANNEXE I.....	<b>92</b>
ANNEXE II .....	<b>96</b>

## TABLEAUX

Tableau 1. <i>Caractéristiques des différents types de fibres.</i>	24
Tableau 2. <i>Composition (%) des 3 principaux types de fibres dans les muscles des animaux de la race Romanov.</i>	25
Tableau 3. <i>Type contractile.</i>	43
Tableau 4. <i>Spots protéiques variants entre les quatre muscles des individus des deux génotypes combinés.</i>	58
Tableau 5. <i>Résultats de l'analyse SELDI.</i>	69
Tableau 6. <i>Séquences des différentes amorces PCR utilisées.</i>	73
Tableau 7. <i>Expression des ARN foetaux.</i>	75
Tableau 8. <i>Expression des ARN du vastus medialis.</i>	76
Tableau 9. <i>Expression des ARN du semimembranosus.</i>	76
Tableau 10. <i>Rapports des expressions des ARNm des différents gènes dans les différents tissus analysés.</i>	78

# FIGURES

Figure 1: <i>Structure et organisation du muscle squelettique.</i>	9
Figure 2. <i>La fibre musculaire</i>	11
Figure 3: <i>Coupe transversale d'une fibre musculaire.</i>	12
Figure 4: <i>Coupe longitudinale de fibres musculaires présentant une striation typique.</i>	12
Figure 5: <i>Ultra-structure du sarcomère.</i>	13
Figure 6: <i>Représentation schématique du métabolisme énergétique cellulaire (glycolyse, fermentation, respiration) et des bilans énergétiques.</i>	17
Figure 7: <i>Chaîne de transport des électrons.</i>	19
Figure 8: <i><math>\beta</math>-oxydation des acides gras dans la mitochondrie.</i>	22
Figure 9: <i>La myogenèse.</i>	26
Figure 10: A: Texel Belge. B: Texel.	28
Figure 11: <i>Schéma de régulation de la prolifération et de la différenciation des myoblastes par la Myostatine (Mstn).</i>	30
Figure 12: <i>Représentation schématique de l'IEF.</i>	32
Figure 13: <i>Représentation schématique de la migration en 2<sup>ème</sup> dimension.</i>	33
Figure 14: <i>Migration en électrophorèse bidimensionnelle des différentes fractions.</i>	35
Figure 15: <i>Barettes d'analyse SELDI Cypherger.</i>	38
Figure 16: <i>Les protéines ionisées sont détectées et leur masses estimées sur leur temps de vol.</i>	38
Figure 17: <i>Etapes schématiques de la PCR en temps réel.</i>	41
Figure 18: <i>Amplification des ADNc de la myostatine (GDF-8).</i>	42
Figure 19: <i>Courbe standard.</i>	42
Figure 20: <i>Coupes transversales de la cuisse et du dos.</i>	44
Figure 21. <i>Profils d'expression des protéines différentiellement exprimées.</i>	59-61
Figure 22. <i>Profils d'expression des protéines issues de l'analyse globale.</i>	65-66
Figure 23: <i>Exemples de migrations de contrôle des ARN sur gel d'agarose 1%.</i>	74
Figure 24. <i>Exemples d'amplifications PCR tests.</i>	74

## INTRODUCTION

La filière française de production ovine souffre depuis longtemps de sa faible compétitivité en terme de prix à la production. Sa survie est subordonnée au maintien d'un haut niveau de qualité, qu'il s'agisse de qualité physique (sanitaire, sensorielle) ou symbolique (mode de production, origine). La filière ovine française a donc mis en place depuis vingt ans un dispositif de sélection génétique sur des critères de qualité de la carcasse des agneaux. L'interprofession affiche par ailleurs une volonté de "traçabilité", garante d'une qualité liée à l'authenticité d'une production de terroir, et de démarcation par rapport à des agneaux d'importation. Actuellement les programmes de sélection portent essentiellement sur la vitesse de croissance et sur des caractéristiques de rendement (en carcasse et en muscle), de développement musculaire et d'état d'engraissement. Les deux premiers critères interviennent dans le coût de production et les deux derniers dans l'évaluation commerciale des animaux. Pour augmenter leur compétitivité face aux éleveurs de races à viandes les éleveurs français cherchent à améliorer la musculation des agneaux c'est-à-dire l'épaisseur relative des muscles par rapport aux dimensions du squelette. Ce caractère est, en partie, évalué par la note de conformation des carcasses. L'utilisation d'animaux hypertrophiés par croisements est donc envisagée pour améliorer la conformation de races moins bien conformées. Depuis 7 ans les unités INRA QuaPA (Qualité des Produits Animaux) et SAGA (Station d'Amélioration Génétique des Animaux) développent en commun des travaux de recherche sur l'évaluation du développement musculaire et sur les relations entre ce dernier et la composition du tissu musculaire.

Il a été mis en évidence dans la race Texel Belge un locus d'hypertrophie musculaire (QTL). [1] Les animaux porteurs de ce QTL présentent une plus forte musculature et un taux de gras plus faible, sans altération notable des qualités sensorielles et de texture de la viande. Souvent les sélections des espèces de rente sur un meilleur développement musculaire ou sur une vitesse de croissance plus élevée ont également abouti à des défauts de tendreté et de jutosité des viandes, il en va ainsi pour le modèle Callipyge ovin où le développement musculaire est accompagné d'une dureté de la viande. Le QTL Texel Belge est donc un bon candidat pour améliorer la conformation sans nuire à la qualité de viande. Il se situe sur le chromosome 2, dans une région incluant le gène de la myostatine, impliquée dans les hypertrophies bovine. La mutation a finalement été identifiée dans le gène de la myostatine à la fin de l'année 2005 [2] par l'équipe de Michel Georges à Liège. La Recherche de la mutation faisait partie intégrante d'un projet (ANR-GENANIMAL) mis en place pour caractériser les effets du QTL sur des critères de production mais également d'en étudier les modalités d'expression au niveau de la structure cellulaire, du transcriptome et du protéome.

Pour finalement identifier le gène responsable, beaucoup plus aisé à utiliser dans le cadre de la sélection d'animaux.

L'objectif de ma thèse a donc été, au sein de ce projet, de caractériser au niveau du protéome musculaire le phénotype associé au génotype homozygote Texel afin d'élucider les mécanismes enzymatiques et métaboliques impliqués dans l'hyper-développement musculaire en se basant sur la typologie de différents muscles.

La première partie de ce travail s'attachera à montrer qu'il n'y a pas un tissu: le muscle, mais plusieurs tissus musculaires aux constituants, aux métabolismes et aux rôles différents. Nous présenterons ensuite les méthodes que nous avons choisies pour investiguer ce sujet complexe qu'est le protéome musculaire et en particulier l'analyse d'une fraction encore méconnue du protéome musculaire: les protéines sarcoplasmiques.

La seconde partie est consacrée à la présentation des résultats expérimentaux et à leur discussion à la fois sous forme de publications et d'analyses complémentaires des résultats ; Ainsi qu'à l'essai d'une technique alternative de protéomique et à l'analyse du transcriptome. Nous avons, dans un premier temps, montré que les différences inter-muscles se répercutaient sur le protéome du sarcoplasme. Puis nous avons identifié les effets de la mutation Texel sur le protéome sarcoplasmique de différents muscles et nous avons mis en évidence certaines protéines qui, eu égard à leurs rôles sur la croissance des myoblastes, pourraient être impliquées dans le développement de l'hyperplasie musculaire des animaux homozygotes Texel. Finalement nous avons montré que ces protéines étaient régulées au niveau post-transcriptionnel et que l'on pouvait observer une sous-expression des ARNm de la myostatine chez les homozygotes Texel pour la mutation. L'ensemble de ce travail peut constituer une base, un point de départ pour une étude approfondie au niveau du développement foetal lors de la mise en place du muscle.

# **Partie I. Présentation.**

# CHAPITRE I. GENERALITES BIOLOGIQUES

## I. STRUCTURE ET ORGANISATION DU TISSU MUSCULAIRE

Les muscles représentent chez l'homme environ 45% du poids corporel, soit 30 Kg pour un individu de 75 Kg, et au moins 25% du renouvellement de l'ensemble des protéines se produit dans ce tissu [3].

Il existe deux catégories de muscles :

- Muscles lisses, qui sont situés dans les parois des viscères, des vaisseaux, ... Ils obéissent au système nerveux végétatif et ont une contraction lente et prolongée.
- Muscles striés, qui sont attachés au squelette, terminés habituellement par des tendons, soumis le plus souvent au système nerveux sympathique (mouvement volontaire) et parasympathique (réflexes et posture), et ont une contraction rapide et brève. Ils sont les agents de la mobilité et permettent d'effectuer différents mouvements.

### *1.1. Le muscle squelettique: Structure et organisation*

Les muscles squelettiques représentent à eux seuls 40% du poids du corps (les muscles lisses et le cœur 5%).

Une coupe transversale d'un muscle montre qu'il est formé d'un grand nombre de petites structures tubulaires: les fibres musculaires qui se présentent groupées en paquets appelés faisceaux musculaires. Chaque niveau de structure est maintenu par une trame conjonctive sur laquelle s'attachent les fibres musculaires. On distingue ainsi, de la périphérie vers le centre, les enveloppes conjonctives suivantes : épimysium, périmysium et endomysium. La dernière enveloppe conjonctive est celle qui entoure chaque fibre musculaire: la cellule périthéliale ou périvasculaire. C'est dans la membrane conjonctive limitant chaque faisceau que cheminent les vaisseaux sanguins et les terminaisons nerveuses. Les éléments conjonctifs se groupent aux extrémités pour former les tendons qui se fixent sur les os. (figure 1).

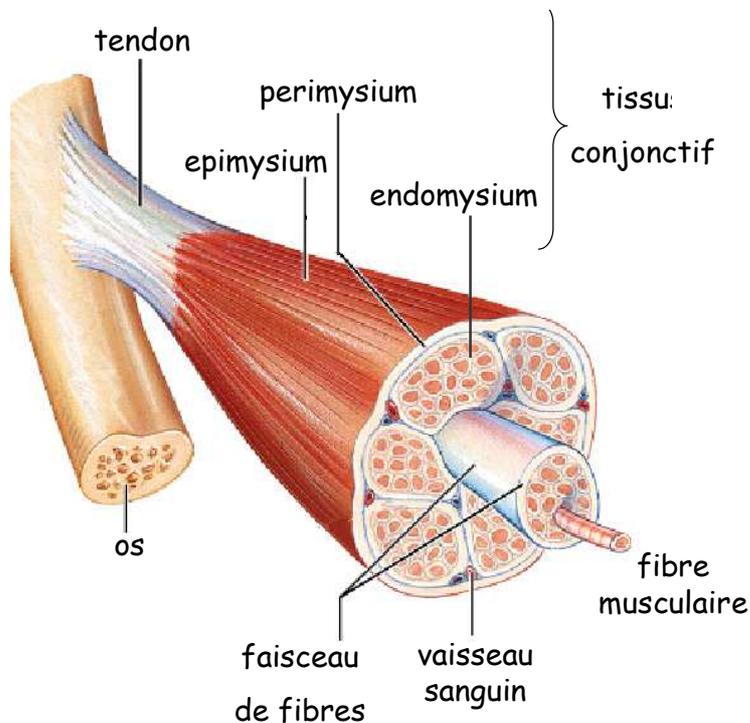


Figure 1 : Structure et organisation du muscle squelettique.

d'après Benjamin Cummings (2001)

Ainsi le muscle squelettique est constitué de plusieurs types de tissus : musculaire à proprement parlé, conjonctif, nerveux, adipeux et vasculaire. Le tissu musculaire comprend l'ensemble des protéines permettant la contraction du muscle. Le tissu conjonctif assure le maintien de la structure du muscle et permet la transmission de la force développée par celui-ci aux pièces osseuses. Le tissu nerveux participe tant à la production qu'à la régulation de la force et du tonus musculaire. Quant aux lipides intramusculaires, ils représentent une proportion variable de la masse musculaire (de 1 à 5 %, voir davantage).

De même au niveau cellulaire, le muscle strié se compose d'une part de cellules spécifiques au muscle, que sont les cellules musculaires et les cellules satellites, et d'autre part de cellules non spécifiques que sont les cellules endothéliales, les adipocytes, les neurones, les fibroblastes et les cellules du système immunitaire.

### I.1.a. Les cellules satellites

Ce sont des cellules mononucléées, structurellement indifférenciées, mais spécifiques du muscle. Elles sont situées en périphérie des fibres musculaires [4] et sont logées dans un espace délimité par le sarcolemme et la lame basale du muscle. En microscopie optique, le noyau de la cellule satellite apparaît dans l'alignement des noyaux des fibres, surtout dans les muscles âgés. La capacité de régénération du muscle n'a été découverte qu'à la fin des années 1950. Ce sont les cellules satellites qui en sont responsables [4]. Les cellules satellites sont caractérisées par leur détermination myogénique; en particulier, elles expriment le facteur de transcription myogénique "Myogenic Factor 5" (Myf-5) et la M-

cadhérine, une protéine d'adhésion cellulaire spécifique du muscle [5]. Dans le muscle normal adulte, elles restent en phase G<sub>0</sub> du cycle cellulaire, lors d'une blessure elles vont proliférer, se différencier en myoblastes pour finalement fusionner avec la myofibre [6, 7].

### I.1.b. Les vaisseaux sanguins et les nerfs

Les muscles requièrent une importante vascularisation qui leur procure les nutriments et l'oxygène dont ils ont besoin et qui élimine les déchets chimiques. Chaque muscle est nourri par une artère et l'élimination des déchets se fait par une ou plusieurs veines. L'action normale d'un muscle squelettique dépend aussi de son innervation. Chaque fibre musculaire squelettique possède une terminaison nerveuse. Chaque faisceau musculaire composé de plusieurs fibres reçoit un message nerveux qui provoque la contraction volontaire du muscle. Un même motoneurone innerve plusieurs fibres musculaires. L'ensemble du motoneurone et des fibres musculaires innervées par ce motoneurone s'appelle une unité motrice. Toutes les fibres musculaires d'une même unité motrice possèdent des propriétés physiologiques, histochimiques et enzymatiques similaires et sont activées de façon synchrone après stimulation de la fibre nerveuse. Les fibres musculaires d'une même unité motrice ne sont pas contigues mais dispersées. La taille des unités motrices est variable, elle peut aller de 3 fibres pour les muscles oculaires, jusqu'à 1000 fibres pour les muscles de la jambe. Le stimulus qui provoque la contraction musculaire prend naissance dans le cortex cérébral, traverse la moelle épinière et la racine nerveuse jusqu'à la plaque neuromusculaire, jonction entre la fibre nerveuse et la surface musculaire. A l'arrivée de cet influx nerveux, le neuromédiateur (Acétylcholine) libéré par le nerf moteur stimule la fibre musculaire. Cette stimulation met en jeu une dépolarisation membranaire qui traverse la fibre musculaire en une milliseconde et provoque la contraction.

### I.1.c. Les fibroblastes

Cellule d'origine mésodermique présente chez tous les Vertébrés, le fibroblaste est la cellule du tissu conjonctif : elle est donc omniprésente. Par ses activités de synthèse et d'excrétion, le fibroblaste contribue à assurer l'équilibre métabolique indispensable au maintien de l'intégrité des tissus. Ces cellules sont fusiformes ou étoilées et émettent des prolongements cellulaires permettant leur croissance. Elles sont très riches en organites cytoplasmiques, ce qui témoigne de leur grande activité métabolique. Ces cellules sont à l'origine des divers composants de la matrice extracellulaire (collagène, fibronectine, protéases).

### I.1.d. La fibre musculaire

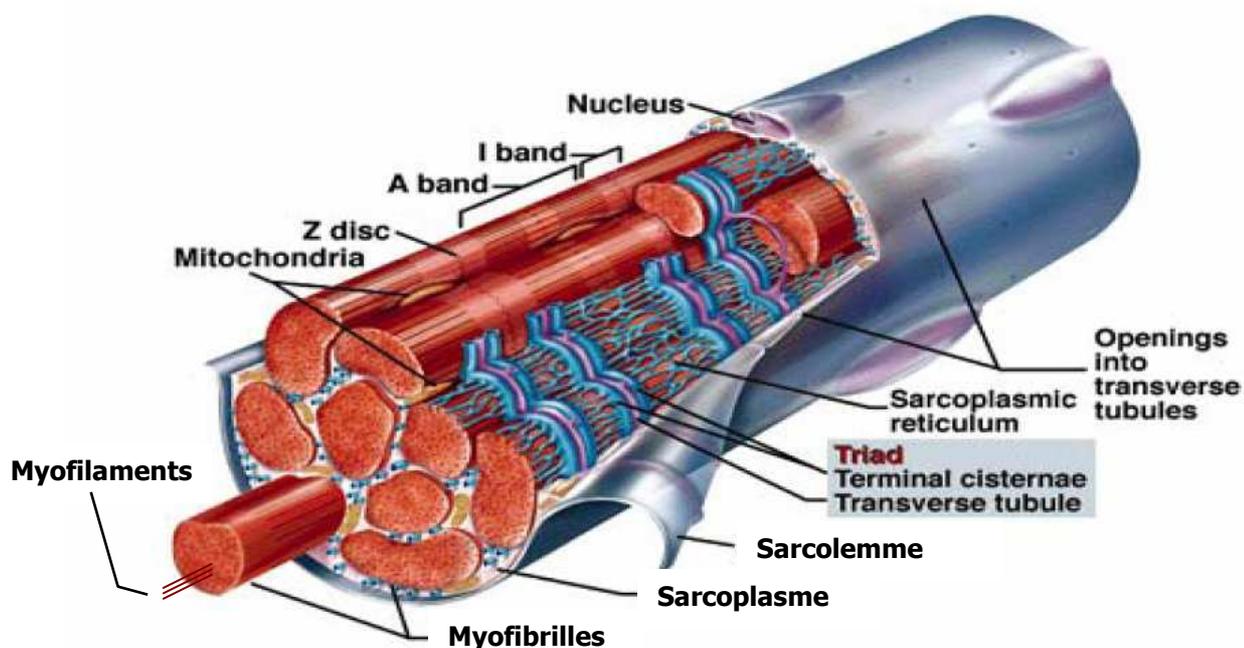


Figure 2. La fibre musculaire

Chaque fibre musculaire (ou myofibre) correspond à une entité cellulaire du muscle (figure 2). La fibre musculaire est l'une des cellules les plus longues de l'organisme. Ces fibres sont des syncytiums multinucléés issus de cellules fusionnées, les myofibrilles, et peuvent contenir plusieurs centaines de noyaux localisés en position périphérique (figure 2, figure 3). Elles se présentent comme des fuseaux longs et fins d'un diamètre de 10 à 200 $\mu$ m et d'une longueur pouvant atteindre 30cm chez l'homme. Elles sont regroupées en différents faisceaux contigus. Le cytoplasme, appelé sarcoplasme, baigne les myofibrilles qui occupent la presque totalité du volume intracellulaire.

Les fibres musculaires sont entourées d'une membrane robuste, le sarcolemme; l'ensemble constituant une structure à haute résistance mécanique. L'architecture du sarcolemme est beaucoup plus complexe que celle de la membrane plasmique entourant les cellules mononucléées classiques. Elle présente, à intervalles réguliers, des tubules transverses qui constituent un réseau d'invaginations à l'intérieur de la cellule. Ces invaginations de sarcoplasme donnent à la fibre une striation longitudinale (figure 4).

Le sarcolemme possède aussi des domaines spécialisés au niveau des jonctions neuromusculaires et des jonctions myotendineuses.

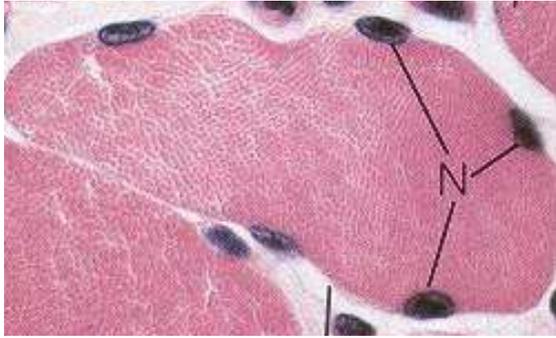


Figure 3: Coupe transversale d'une fibre musculaire.

N : Noyaux rejetés en périphérie.

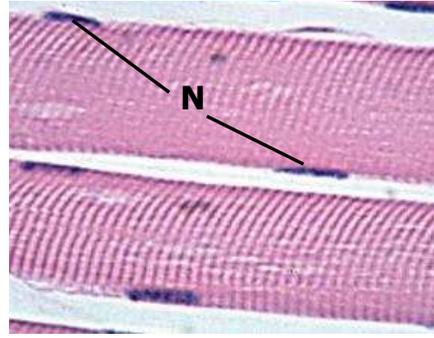


Figure 4: Coupe longitudinale de fibres musculaires présentant une striation typique.

N : Noyaux périphériques.

Comme dans toute cellule le sarcoplasme contient des organites du système de trafic intracellulaire (réticulum sarcoplasmique, appareil de Golgi), des mitochondries (sarcosomes) et un pigment respiratoire particulier, la myoglobine. Réticulum sarcoplasmique et appareil de Golgi sont répartis sur toute la longueur de la fibre, quelque soit le type musculaire [8]. Le réticulum sarcoplasmique est localisé dans la région périnucléaire, mais également le long de la strie Z [9, 10]; les appareils de Golgi sont situés autour des myonucléi à la surface des fibres et aussi entre les myofibrilles (figure 2). Le réticulum sarcoplasmique entoure les myofibrilles. A intervalles réguliers, il présente des manchons dilatés formant des citernes terminales qui jouxtent les tubules transverses (système T). Un tubule et les citernes qui l'entourent forment une triade. A ce niveau, les membranes des tubules et du réticulum forment les zones de couplage électrophysiologique qui transmettent l'influx nerveux à l'intérieur de la cellule, et induisent la libération des ions calciques nécessaires à la contraction des myofibrilles.

Outre ces éléments on trouve également dans le sarcoplasme du glycogène, des lipides et des enzymes du métabolisme.

### I.1.e. Structure de la myofibrille

Les myofibrilles occupent la quasi totalité de la fibre musculaire (figure 2). Au fort grossissement du microscope, chaque myofibrille montre une alternance de zones claires et de zones sombres qui se correspondent d'une myofibrille à l'autre, ce qui donne à la fibre sa striation transversale. Les zones sombres sont appelées disques sombres ou Bandes-A (Figure 5). Elles sont traversées en leur milieu par une bande claire appelée bande-H dont l'épaisseur varie selon l'activité du muscle. Les zones claires appelées disques clairs ou Bandes I sont coupées en leur milieu par une ligne sombre appelée strie-Z. La portion de la myofibrille comprise entre deux stries Z successives constitue l'unité de contraction du

muscle et est appelée sarcomère. Les myofibrilles sont donc constituées de sarcomères placés en série.

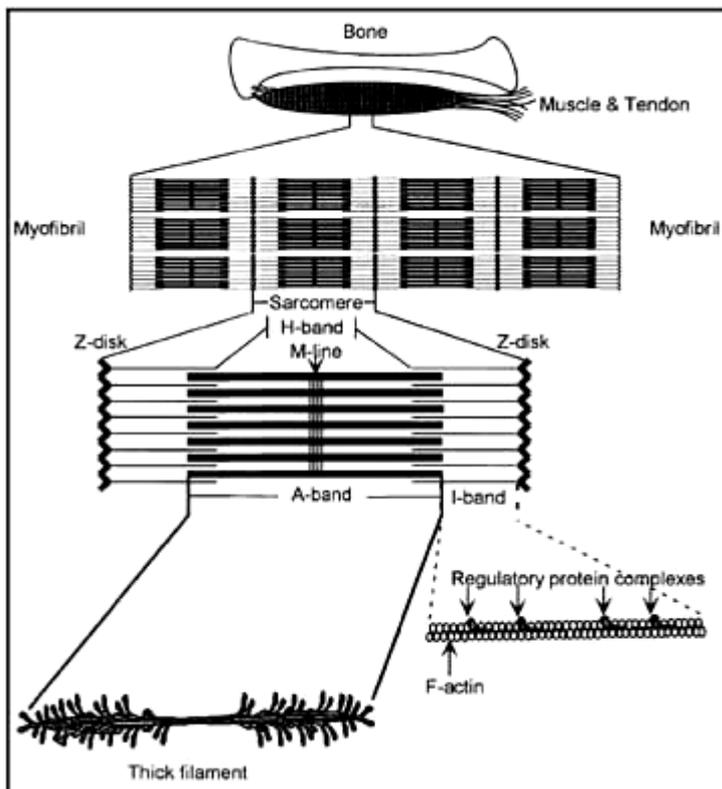


Figure 5: Ultra-structure du sarcomère présentant la composition myofibrillaire entre deux bandes Z.

Relation schématique entre les composants biochimiques et la structure microscopique du muscle.

L'alternance des bandes claires et des bandes sombres traduit l'existence de filaments de deux sortes :

- Des filaments épais dont le diamètre varie de 12 à 18 nanomètres constitués de myosine
- Des filaments minces dont le diamètre varie de 5 à 8 nanomètres constitués d'actine.

Les filaments d'actine sont traversés par la ligne Z en leur milieu. Un filament d'actine appartient à deux sarcomères voisins.

La bande-H n'est constituée que de filaments de myosine. L'épaississement (dans leur partie moyenne) des filaments de myosine constitue la ligne M, celle-ci se trouve donc au centre du sarcomère.

Transversalement, chaque filament épais de myosine est entouré par six filaments minces d'actine placés en hexagone et chaque filament mince est entouré de trois filaments épais placés en triangle. [11]

En plus du réseau acto-myosine, le sarcomère contient deux autres réseaux de filaments : la titine et la nébuline. Ces réseaux de filaments intermédiaires et de microtubules participent à la mise en place et à l'organisation des myofibrilles. Le muscle strié squelettique possède donc un cytosquelette cellulaire fortement adapté à sa fonction de générateur et de transmetteur de forces mécaniques.

## *I.2. Mécanistique de la contraction musculaire*

### I.2.a. Actine et Myosine : base de la contraction musculaire

Les filaments d'actine, longs de  $1\mu\text{m}$ , sont constitués de deux hélices alpha enroulées, issues de la polymérisation de monomères d'actine. Il existe plusieurs isoformes d'actine, codées par différents gènes. Dans le muscle strié adulte, c'est l' $\alpha$ -actine squelettique qui prédomine. Les filaments d'actine sont associés aux protéines régulatrices de tropomyosine [12] et de troponines (Tn) I, C, et T [13] et ont pour molécules chaperonnes la tropomoduline et l'actin-Capping protein (CapZ) [14, 15].

La myosine est composée de deux chaînes lourdes et de quatre chaînes légères. Classiquement, ces molécules sont décrites comme possédant une tête et une queue. Les têtes de myosines qui comprennent l'extrémité N-terminale de la chaîne lourde et les chaînes légères interagissent avec l'actine et constituent le domaine moteur. L'extrémité C-terminale des chaînes lourdes s'ancre au niveau de la bande M. On trouve de nombreuses isoformes de myosines lourdes et légères, dont l'expression varie suivant le type de muscle (lent ou rapide) et est adaptée aux forces développées. Les filaments de myosine sont associés aux "myosin binding proteins" (MyBP) C et H [16]. Ces protéines possèdent elles aussi des isoformes dont l'expression varie selon le type musculaire [17]. Leur affinité pour la myosine est très forte et elles participent au bon déroulement de la polymérisation de la myosine. Un deuxième partenaire de la myosine est l'AMP-désaminase, impliquée dans la régulation du métabolisme de l'ATP/ADP et qui est activée au cours de la contraction musculaire [18].

La théorie qui prévaut actuellement pour expliquer comment les muscles créent des tensions internes (forces) est celle dite "des filaments glissants" de Huxley (1957) basée sur le modèle de Huxley & Hanson [19]. Lors de la contraction musculaire, les filaments d'actine s'associent aux filaments de myosine par l'intermédiaire des molécules de tropomyosine et de troponine [pour revue voir 20]. Suite à la liaison actine-myosine, la fonction ATPasique de la myosine est activée. L'hydrolyse de l'ATP génère une rotation de la tête de myosine et un déplacement des molécules d'actine de  $100\text{\AA}$  par rapport aux molécules de myosine. Ce mouvement est à l'origine de la contraction musculaire.

### I.2.b. Stabilisation du complexe actine-myosine

Les filaments de titine et de nébuline stabilisent l'alignement des filaments fins et épais. La production active de force dans les muscles squelettiques résulte de l'interaction des filaments épais de myosine avec les filaments fins d'actine. Les muscles sont également passivement élastiques, produisant des forces de résistance à l'étirement, indépendamment du clivage de l'ATP ou de l'interaction entre les filaments. Le mécanisme assurant cette

élasticité passive est encore inconnu mais deux systèmes protéiques sont mis en cause dans ce mécanisme : les protéines titine (connectine) et nébuline. Ces deux protéines de grande taille (respectivement 3,5 et 0,9MDa) apportent une continuité axiale assurant la production des tensions de repos lors de l'étirement et tendent à maintenir les filaments épais en position centrale dans le sarcomère lors de la génération des forces.

La titine s'étend sur un demi sarcomère, du disque Z (extrémité N-terminale) à la ligne M (extrémité C-terminale). Sa séquence est constituée à 90% de répétitions de domaines immunoglobuline et de domaines fibronectine de type III [21]. Les 10% restant correspondent à 17 régions uniques ne comportant aucune homologie avec des séquences connues. Elle comprend un domaine kinase et participerait donc à la signalisation moléculaire. Pouvant interagir avec de nombreux partenaires sur toute sa séquence, elle constitue une matrice organisatrice et une plate-forme pour différents systèmes moléculaires (téléthonine,  $\alpha$ -actinine, protéines MyBP-C et AMP-désaminase, myosine, calmoduline, MURF-1, myoméline et calpaïne-3). Ces nombreuses interactions confèrent à la titine de nombreuses fonctions que ce soit au niveau de la contraction, de la gestion des forces mécaniques, ou lors de la myofibrillogénèse.

La nébuline comprend 185 motifs modulaires de 35 acides aminés chacun. Son extrémité C-terminale se fixe au niveau du disque Z et celle N-terminale s'étend jusqu'à l'extrémité du filament d'actine [22-24]. Les modules centraux de la nébuline lient l'actine, d'autres semblent reconnaître la tropomyosine et les troponines, alors que ceux N-terminaux lient la tropomoduline. La nébuline forme ainsi un filament composite avec le complexe actine/tropomyosine/troponine. Il a été suggéré que la nébuline inextensible sert de matrice pour la mise en place de la bande I et que sa longueur dicte celle des filaments d'actine [25]. Enfin, les modules de nébuline recouvrant la jonction A-I se lient aussi à la myosine et à la calmoduline, inhibant l'activité ATPasique de la myosine et participant donc à la régulation de la contraction musculaire [24, 26].

### I.2.c. Relaxation musculaire

Les vitesses de contraction et de relaxation du muscle sont dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$ . Au repos le  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique est présent dans une gamme de concentrations allant de 50nM dans les fibres rapides à 100-300nM dans les fibres lentes [27]. L'influx nerveux, signal de la contraction, modifie le potentiel électrochimique du réticulum sarcoplasmique, les canaux calciques s'ouvrent et le  $\text{Ca}^{2+}$  est relargué dans le sarcoplasme. Sa concentration cytoplasmique peut-être ainsi brusquement augmentée d'un facteur 100. La contraction musculaire est déclenchée.

La relaxation du muscle est liée à la chute de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique et à la séquestration de ce dernier par le réticulum sarcoplasmique. Cette séquestration est facilitée

par la présence de protéines ayant une forte affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$ , telle la parvalbumine, et l'acheminant plus rapidement vers les pompes calciques du réticulum. Cette protéine est plus exprimée dans les fibres de type rapide que dans les fibres de type lent [28] ce qui explique la différence de vitesse de relaxation entre ces types de fibre.

## II. METABOLISME MUSCULAIRE

### *II.1. Les sources d'énergie pour la contraction*

La contraction musculaire est assurée par des phénomènes très complexes. Les fibres musculaires possèdent peu de réserves énergétiques (glucides,  $\text{O}_2$ , ATP), presque tout leur est apporté par la circulation sanguine. L'énergie nécessaire à la production des réactions chimiques responsables de la contraction est apportée essentiellement par une molécule particulière, l'ATP (adénosine tri-phosphate).

Après utilisation de l'ATP présent dans les cellules, il peut être renouvelé :

- par la dégradation de la phosphocréatine (ou créatine phosphate) présente dans le muscle et permettant le fonctionnement musculaire pendant quelques secondes (épuisement très rapide de cette "réserve" disponible immédiatement)
- par la dégradation du glucose cellulaire (apporté par la circulation sanguine) par deux voies métaboliques. La voie glycolytique dans des conditions d'anaérobiose et la voie oxydative en conditions d'aérobiose.
- par dégradation des acides gras à chaînes moyennes et courtes (<18 carbones) par la  $\beta$ -oxydation dans la matrice mitochondriale (hélice de Lynen). Toutefois cette réaction est impossible en absence totale de glucides. Cette caractéristique métabolique des glucides est appelée "anapleurèse". (Figure 6)

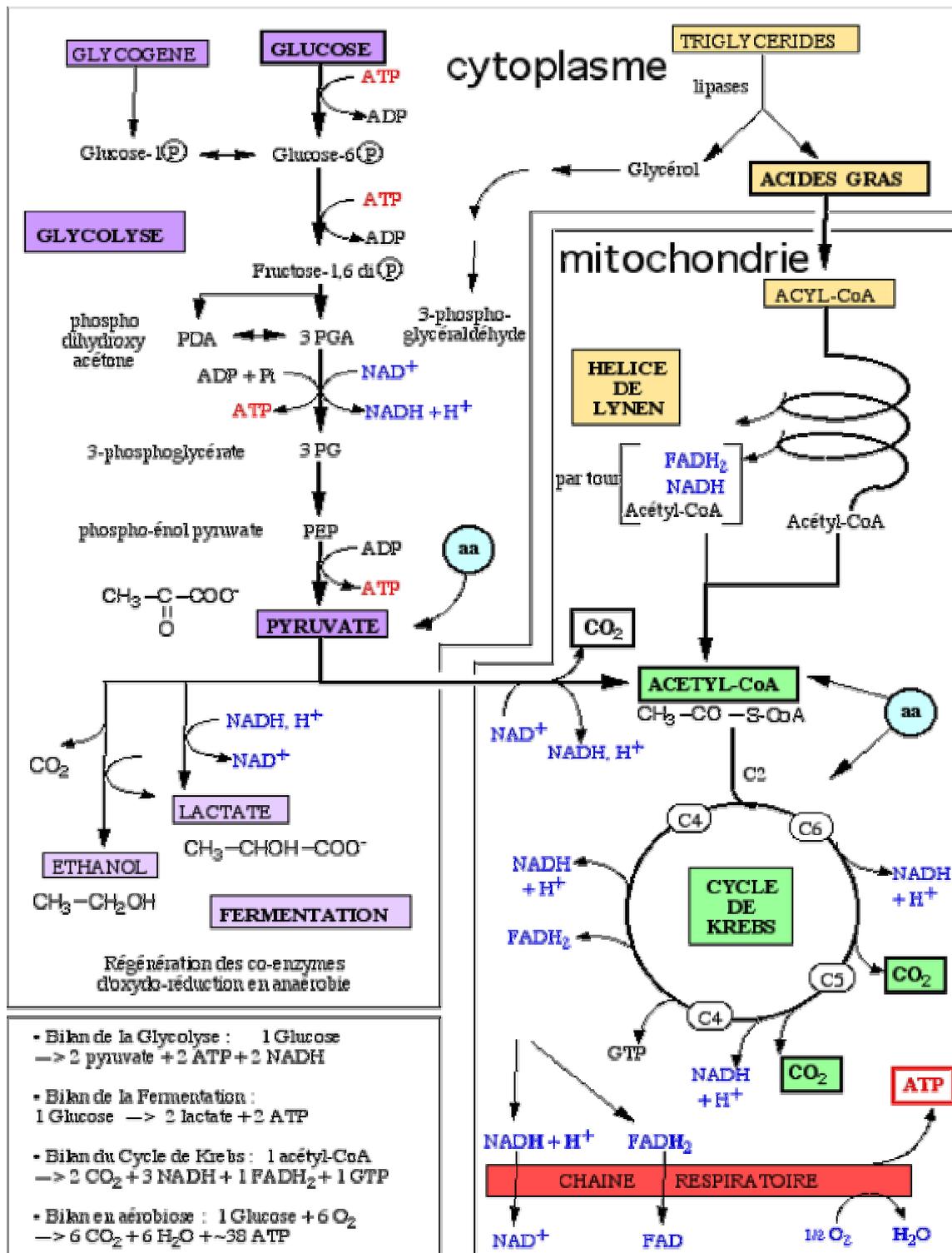


Figure 6: Représentation schématique du métabolisme énergétique cellulaire (glycolyse, fermentation, respiration) et des bilans énergétiques.

Les substrats énergétiques présents dans le cytoplasme sont transportés dans la mitochondrie. Dans la membrane interne mitochondriale, la synthèse d'ATP par l'ATP synthétase est couplée, par un gradient électrochimique de protons, à la consommation d'oxygène au niveau de la chaîne respiratoire. D'après le site: [www.snv.jussieu.fr/.../metabo/metabo1.html](http://www.snv.jussieu.fr/.../metabo/metabo1.html)

### II.1.a. La glycolyse

La glycolyse, ou voie D'EMBEN-MEYEROFF-PARNAS, dégrade le glucose avec production d'ATP et de métabolites intermédiaires qui peuvent être repris dans d'autres séquences métaboliques. Elle se déroule entièrement dans le cytoplasme. C'est le processus indispensable qui prépare à la dégradation des glucides métabolisables.

La glycolyse est une série de réactions enzymatiques au nombre de 10, catalysées par 10 enzymes. Elles sont toutes localisées dans la fraction soluble du cytoplasme. Elle est divisée en deux grandes phases :

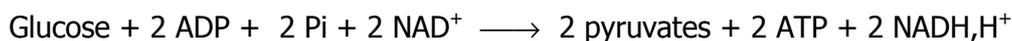
- La première phase est celle où convergent un grand nombre d'hexoses métabolisables après leur phosphorylation ou après la phosphorolyse des polyosides aux dépens de l'ATP. Ils sont ensuite tous transformés en un produit commun qui est le glycéraldéhyde 3- $\text{P}$ <sup>1</sup>. On l'appelle encore phase de consommation de l'ATP. A la fin de cette phase tous les hexoses présentent la réaction globale suivante :



- La deuxième phase, commune à tous les hexoses, est caractérisée par une séquence de réactions qui conduit à la formation d'un pyruvate, de 2 ATP et d'un NADH,H<sup>+</sup>, suite à l'oxydation d'un glycéraldéhyde 3- $\text{P}$ . A la fin de cette phase on obtient:



Le bilan final conduit à la formation de 4 ATP et à la consommation de 2 ATP. La dégradation d'une molécule de glucose dans la glycolyse conduit donc à la synthèse de 2 ATP et à la formation de 2 NADH,H<sup>+</sup> et de 2 pyruvates, d'où la réaction globale :



### II.1.b. Glycolyse anaérobie

Lorsque la cellule est privée d'oxygène (anaérobiose) ou en conditions hypoxiques (tissu musculaire en contraction rapide), le pyruvate (CH<sub>3</sub>-CO-COOH) est réduit en lactate (CH<sub>3</sub>-CHOH-COOH) par le NADH,H<sup>+</sup> formé au cours de la glycolyse. La réaction catalysée par la lactate déshydrogénase régénère le NAD<sup>+</sup>.



Dans les conditions citées, la réaction globale de la dégradation du glucose est :



Le lactate est le produit final de la dégradation du glucose. Il diffuse dans le milieu extracellulaire et constitue un déchet. Ce dernier, déversé dans le sang chez le mammifère, peut être retransformé dans le foie en glucose (Cycle des CORI).

---

<sup>1</sup> - $\text{P}$ : Groupement phosphate.

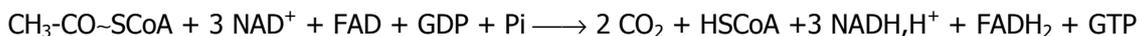
<sup>2</sup> Pi: Phosphate inorganique, HPO<sub>4</sub><sup>-</sup>.

## II.1.c. Métabolisme oxydatif et phosphorylation oxydative

Le pyruvate est transporté dans la mitochondrie. Il est d'abord transformé par le complexe multi-enzymatique de la pyruvate déshydrogénase en acétyl-CoA (HSCoA).



L'oxydation complète de l'acétyl-CoA est réalisée dans le cycle de Krebs (Figure 6) et s'accompagne de la formation de 3 NADH,H<sup>+</sup>, 1 FADH<sub>2</sub> et de 1 GTP. La réaction globale de l'oxydation de l'acétyl-CoA est :



L'ensemble des coenzymes réduits formés (NADH,H<sup>+</sup> cytosoliques et mitochondriaux, FADH<sub>2</sub>) pendant la dégradation complète du glucose est régénéré lors de leur oxydation par la chaîne respiratoire. (Figure 7)

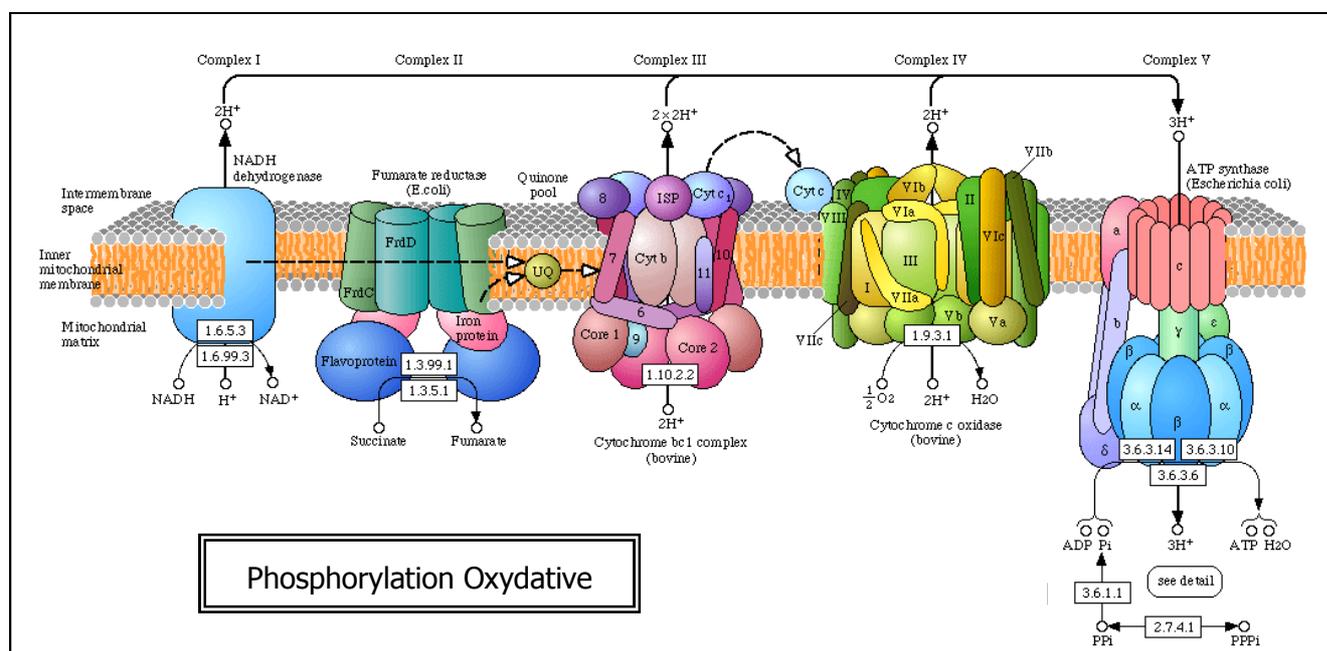


Figure 7. Chaîne de transport des électrons. Ce diagramme, illustre les principales réactions impliquant les accepteurs d'électrons de part et d'autre de la membrane interne de la mitochondrie. Parallèlement au transport des électrons, des protons sont pompés dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie. C'est à partir de ce gradient électrochimique que l'ATP est produit par phosphorylation oxydative.

Image provenant du site KEGG: <http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map00190.html>

La chaîne respiratoire est constituée de 5 complexes multi-protéiques (Complexe I à V) permettant le transfert des électrons dans la membrane interne de la mitochondrie et conduisant à la réduction complète de la molécule d'oxygène en eau. La source de l'énergie métabolique vient de la perte en électrons des produits oxydés de l'alimentation. Ces électrons sont directement acceptés par les transporteurs d'électrons, comme le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD<sup>+</sup>), les flavines mononucléotides (FMN) et adénines dinucléotides (FAD) qui se trouvent ainsi réduits en NADH, FMNH<sub>2</sub> et FADH<sub>2</sub>. Dans la mitochondrie, l'oxydation par l'oxygène de ces cofacteurs réduits va libérer de l'énergie par le biais de la chaîne de transfert des électrons de la membrane interne.

Les protons traversent la membrane interne mitochondriale jusqu'à l'espace intermembranaire créant à la fois une différence de pH et une différence de charge appelées gradient électrochimique. L'énergie de ce gradient est utilisée par le complexe V ou enzyme ATP synthétase pour générer l'ATP. Au final la phosphorylation oxydative et le cycle de krebs auront permis de synthétiser 36 ATP (figure 6).

#### II.1.d. Métabolisme lipidique: la $\beta$ -oxydation

Comparativement au glycogène, les acides gras constituent le plus important stock d'énergie de l'organisme. Ils sont véhiculés dans le cytoplasme par des protéines de transport des acides gras, les FABP (Fatty Acid Binding Protein). Lors de leur passage à travers les membranes mitochondriales ils sont transformés en Acyl-CoA (Acyl-CoA synthétase). Une fois dans la matrice mitochondriale les acyl-CoA subissent plusieurs cycles de  $\beta$ -oxydation (hélice de Lynen, figure 8) fournissant 1 acétyl-CoA au cycle de Krebs et des cofacteurs ( $\text{FADH}_2$  et  $\text{NADH,H}^+$ ) de la phosphorylation oxydative. Le bilan énergétique de la  $\beta$ -oxydation pour un acide gras à 16 carbones est de 129 ATP, correspondant à 8 tours de  $\beta$ -oxydation donnant:  $7 \text{ FADH}_2$  (14 ATP) +  $7 \text{ NADH,H}^+$  (21 ATP) + 8 Acétyl-CoA (96 ATP). L'oxydation du glucose, en équivalent pour 16 carbones, ne fournit que 101 ATP.

Il existe également une  $\beta$ -oxydation des acides gras à très longues chaînes (>18 carbones) dans le peroxyosome, mais elle ne conduit pas à la formation d'acétyl-CoA, elle aboutit à la production de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) réduit par les catalases peroxysoniales.

#### II.2. Métabolisme et stress oxydatif

Dans les cellules, 10 à 15% de l'oxygène non consommé par la mitochondrie, sont disponibles et aptes à oxyder des molécules. On observe ainsi une auto-oxydation de molécules telles que les cofacteurs  $\text{FMN}$  et  $\text{FADH}_2$ , le glycéraldéhyde, les hormones adrénaline et noradrénaline ou des composés contenant un groupement thiol comme la cystéine, qui s'oxydent en réduisant la molécule d' $\text{O}_2$  et génèrent l'anion superoxyde  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . La mitochondrie joue un rôle majeur dans la génération d'espèces réactives de l'oxygène (EROs). Lors du transfert des électrons le long des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, 2% environ des molécules d' $\text{O}_2$  qui entrent dans la chaîne ne sont pas réduites en molécules d' $\text{H}_2\text{O}$  et donnent des dérivés actifs (EROs) tels que : le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), l'ion superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) et le radical hydroxyle ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) [29-33]. La mitochondrie se trouve être aussi une source d'oxyde nitrique  $\text{NO}^{\bullet}$  [34], espèce réactive de l'azote : l' $\text{O}_2^{\bullet-}$  réagit en effet avec le  $\text{NO}^{\bullet}$  pour former un autre oxydant : le peroxyde nitrite ( $\text{ONOO}^{\bullet-}$ ).

Le métabolisme oxydatif du muscle est donc générateur de nombreuses molécules de stress oxydant. Dès les faibles concentrations d'oxygène, l'activité de la cytochrome c oxydase,

enzyme de la chaîne respiratoire, est saturée en oxygène, et on constate pendant le transfert des électrons le long des complexes de la chaîne respiratoire, une fuite de certains de ces électrons. En fait, dans les conditions physiologiques, 1 à 3% des molécules d'oxygène réduites sont transformées en anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$  par les électrons libres. De plus, la glycolyse elle-même est source de composés oxydants, tel le methylglyoxal, un des principaux oxydants dans la cellule [35].

Les compartiments cellulaires sont pour la plupart dotés de moyens de défense de manière à conserver l'intégrité cellulaire lors d'un stress oxydant. De fait, toute substance qui, pour de faibles concentrations comparées au substrat oxydable, retarde ou empêche l'oxydation du substrat est considérée comme un anti-oxydant et les cellules sont équipées d'un impressionnant répertoire d'enzymes et de petites molécules anti-oxydantes [36, 37]. Cela comprend, (1) les systèmes enzymatiques telles la SOD, qui catalyse la dismutation de  $O_2^{\bullet-}$  en  $H_2O_2$ , la catalase et la glutathion peroxydase (GPX) qui convertissent  $H_2O_2$  en eau ; (2) les radicaux hydrophiles comme l'acide ascorbique et l'acide urique, et le glutathion (GSH) ; (3) les radicaux lipophiles tels que les tocophérols, flavonoïdes, caroténoïdes et ubiquinol ; (4) les enzymes impliquées dans la réduction des formes oxydées des petits anti-oxydants moléculaires (GSH réductase, déshydroascorbate réductase) ou responsables de la maintenance des thiols des protéines (thioredoxine réductase) ; et enfin (5) la machinerie cellulaire qui maintient un environnement réducteur par exemple la glucose-6-phosphate déshydrogénase, qui régénère le NADPH lors de la glycolyse [38]. Ainsi les cellules contiennent des mécanismes évolués, adaptés à la lutte anti-oxydants.

Ces systèmes de protection de l'organisme incluent également les protéines de choc thermique (HSP). Les HSP représentent une famille de protéines produites en réponse aux chocs thermiques, aux traumatismes, aux glucocorticoïdes, ou à d'autres agressions [39]. Ces protéines rendent les cellules plus résistantes vis-à-vis d'agressions subséquentes ; elles aident les systèmes de réparation en participant au bon repliement des protéines, au maintien de leurs structures et favorisent le catabolisme des macromolécules trop endommagées.

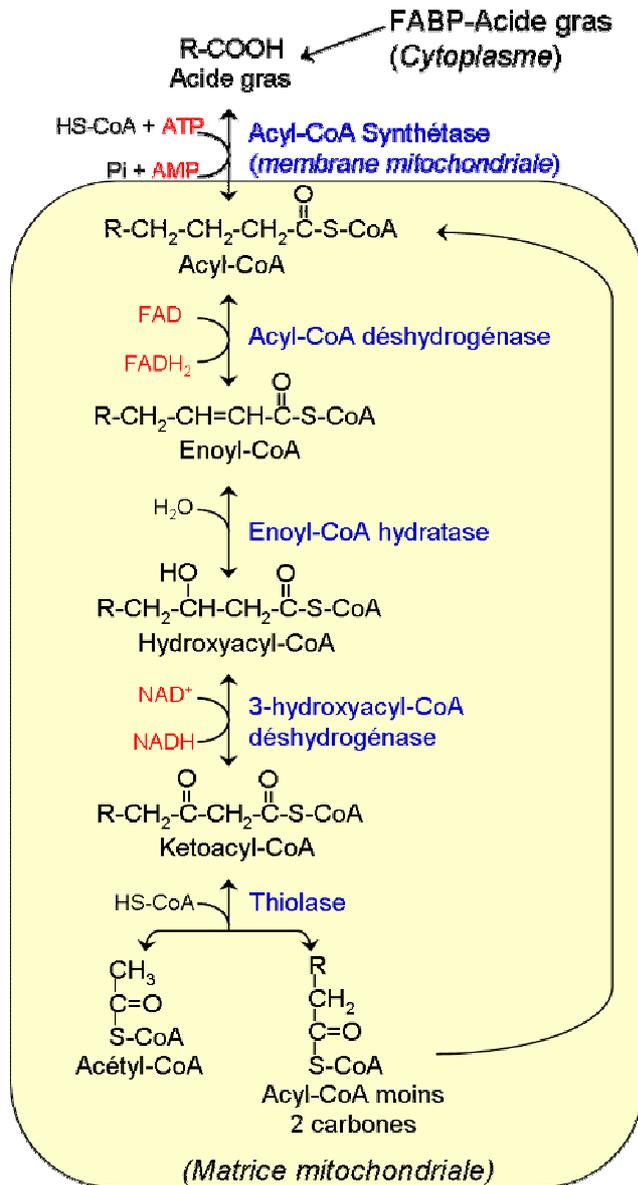


Figure 8.  $\beta$ -oxydation des acides gras dans la mitochondrie.

R- : chaîne carbonée.

FABP: Fatty acid binding protein.

### II.3. Recyclage des protéines

Après un stress oxydant, les protéines endommagées *in vivo* par les EROs et les ERAs (Espèces Réactives de l'Azote) sont prises en charge par des systèmes soit de dégradation protéolytique soit de réparation enzymatique spécifiques, permettant ainsi d'accélérer le renouvellement des protéines fonctionnelles dans les cellules. Ces systèmes enzymatiques de dégradation et de réparation sont présents dans la plupart des compartiments cellulaires notamment dans le cytosol et les mitochondries.

Mis à part certaines modifications réversibles des protéines touchant les résidus méthionines et cystéines, les autres modifications sont irréversibles et le seul moyen d'éliminer les protéines endommagées est leur dégradation ; toutefois, un seuil minimal de dommage semble nécessaire pour que les protéines modifiées soient identifiées comme anormales et engagées dans cette voie protéolytique [40-42]. L'élimination des protéines indésirables,

dans le compartiment cytosolique des eucaryotes, est principalement assurée par le protéasome, un complexe protéolytique multi-catalytique. Le protéasome 26S, constitué du cœur catalytique 20S et d'un régulateur 19S situé à chaque extrémité [43], reconnaît les protéines endommagées après fixation d'une queue poly-ubiquitine, alors que la forme protéasome 20S seule, n'utilise pas la voie de l'ubiquitine pour la dégradation des protéines oxydées. Dans la matrice mitochondriale, siège de la respiration cellulaire et de la production de l'anion superoxyde, les protéines anormales ou à durée de vie réduite sont dégradées par la protéase Lon, une sérine protéase ATP-dépendante [44-46]. Il existe également des protéases de la famille Clp, comme ClpP, une autre sérine protéase, capable de dégrader de courts peptides dans la matrice mitochondriale ; elle peut, en s'associant avec d'autres protéines de la famille Clp, cliver de plus grosses protéines [47].

### III. TYPES DE FIBRES ET DEVELOPPEMENT MUSCULAIRE

#### *III.1. Les types de fibres musculaires et les différents types musculaires*

Dès le XIX<sup>ème</sup> siècle, Louis Antoine Ranvier décrit des fibres rouges et des fibres blanches dans le tissu musculaire. Néanmoins, il faudra attendre l'avènement des techniques d'histoenzymologie pour définir avec plus de précision les fibres musculaires. Les particularités observées sont en relation avec les différentes activités des enzymes oxydatives, donc avec une activité respiratoire forte (I), faible (IIB) ou bien encore intermédiaire (IIA). Le tableau 1 donne l'ensemble des caractéristiques de chaque type de fibre. Il existe d'autres types de fibres (IIC, IIX) qui présentent des caractéristiques intermédiaires, ainsi que des types de fibres spécifiques des stades précoces (Types fœtaux). Chez le mouton adulte, Peinado et al. (2004) [48] ont pu identifier quatre types de fibre I, IIA, IIB, IIC dont certaines fibres IIA (29,4%) présentant une faible activité glycolytique et certaines fibres IIB (33,3%) présentant une intense activité oxydative. Il est à noter que chez le mouton les fibres de type IIA présentent une activité oxydative plus intense que les fibres de type I [49, 50].

TYPES DE FIBRES			
Brooke & Kaiser (1970)	I	IIA	IIB
Ashmore & Doerr (1971)	$\beta$ R	$\alpha$ R	$\alpha$ W
Pertter <i>et al.</i> (1972)	Slow Oxidative (SO)	Fast Oxido-Glycolytic (FOG)	Fast Glycolytic (FG)
<b>Physiologie</b>			
Unité motrice	Slow Fatigable Resistant (S)	Fast Fatigable Resistant (FR)	Fast Fatigable (FF)
Contraction	Lente	Rapide	Rapide
Résistance à la fatigue	+++	++	+
<b>Morphologie</b>			
Surface plaque motrice	+	+++	+++
Réticulum Sarcoplasmique	+	+++	+++
Tubules transverses	+	+++	+++
Couleur	Rouge	Rouge	Blanche
Myoglobine	+++	+++	+
Densité capillaire	+++	++	+
Nb de mitochondries	+++	+++	+
Epaisseur de la strie Z	+++	++	+
Richesse en collagène	+++	++	++
Aire de section	+	+++	+++
<b>Métabolisme énergétique</b>			
Teneur en Glycogène	+	+++	+++
Teneur en Lipides	+++	+++	+
ATPase myofibrillaire	+	+++	+++
Hexokinase	+++	++	+
Phosphorylase	+	++	+++
Enzymes glycolytiques	+	++	+++
Enzymes mitochondriales	+++	++	+

**Tableau 1:** Caractéristiques des principaux types de fibres. D'après Vigneron *et al.* (1976)

Un muscle ne comprend que très rarement un seul type de fibre, en général, un muscle squelettique est constitué de deux ou trois types de fibres (Tableau 2: répartition des 3 principaux types de fibres dans différents muscles chez le mouton). Le type de fibre prédominant donnant les caractéristiques essentielles du muscle. La plupart des muscles sont à prédominance de fibres rapides, les muscles exclusivement rapides ou lents sont rares.

	Type de Fibre		
	I	IIA	IIB
TL	7 ± 4	19 ± 5	74 ± 7
SM	14 ± 5	18 ± 8	68 ± 9
LD	9 ± 4	24 ± 8	66 ± 8
SS	30 ± 9	14 ± 5	56 ± 9
VM	23 ± 5	19 ± 3	58 ± 5

**Tableau 2:** Composition (%) des 3 principaux types de fibres dans les muscles d'animaux de la race Romanov (Hamelin et al., 2006) [51]. SM: *Semimembranosus*, LD: *Longissimus dorsi*, VM: *Vastus medialis*, SS: *Supraspinatus*, TL: *Tensor fasciae latae*.

### III.2. Développement du muscle

La formation du muscle squelettique, myogenèse (figure 9), passe par une série d'étapes qui débute par l'engagement de précurseurs totipotents d'origine mésodermique vers le lignage musculaire. Les prémyoblastes prolifèrent et migrent dans les bourgeons des membres jusqu'à ce qu'ils reçoivent les signaux induisant leur différenciation pour donner naissance aux myoblastes (étape de détermination). Ils sortent alors du cycle cellulaire, fusionnent et se différencient en myotubes.

Les myoblastes sont à l'origine d'au moins deux générations de myotubes [pour revue : 52] :

- les myoblastes primaires, encore appelés myoblastes embryonnaires présents dès le stade embryonnaire, vont fusionner pour donner des myotubes primaires. Ils sont à l'origine, principalement, des fibres lentes, mais aussi de fibres rapides dans les muscles entièrement rapides. Leur taille augmente rapidement dès leur formation ;

- les myoblastes de seconde génération, ou myoblastes foetaux apparaissent au cours de la vie foetale. Ils sont à l'origine, en majorité, des fibres rapides, mais également des fibres lentes dans les muscles mixtes ou entièrement lents. Les myotubes secondaires se développent autour des gros myotubes primaires moins nombreux qui leur servent de support [53].

Au cours d'une dernière étape dite de maturation, les myotubes acquièrent des propriétés contractiles caractéristiques de la fibre musculaire. Après la naissance, il n'y a plus de prolifération cellulaire sauf en conditions pathologiques (cancers, lésions musculaires).

Les cellules satellites sont aussi des myoblastes mais d'apparition plus tardive. Elles ne se différencient pas immédiatement et restent à l'état quiescent. Elles interviennent dans la croissance pré- et post-natale du muscle ainsi que dans sa régénération.

Chez le porc le nombre total de fibres musculaires est atteint à 90 jours de vie foetale, au-delà de cet âge la croissance du muscle est due exclusivement à une hypertrophie des fibres existantes. A la naissance les myotubes primaires sont 5 fois plus gros que les myotubes

secondaires, et seule l'aire de section transversale des fibres augmente jusqu'au poids d'abattage commercial [54].

De nombreux facteurs de transcription myogéniques et de facteurs de croissance sont sécrétés par les tissus environnants [pour revue : 52, 55, 56]. Les régulateurs transcriptionnels de la famille MyoD (MyoD, myogénine, Myf5 et MRF4) sont impliqués dans l'engagement de la cellule somitique vers le lignage musculaire.

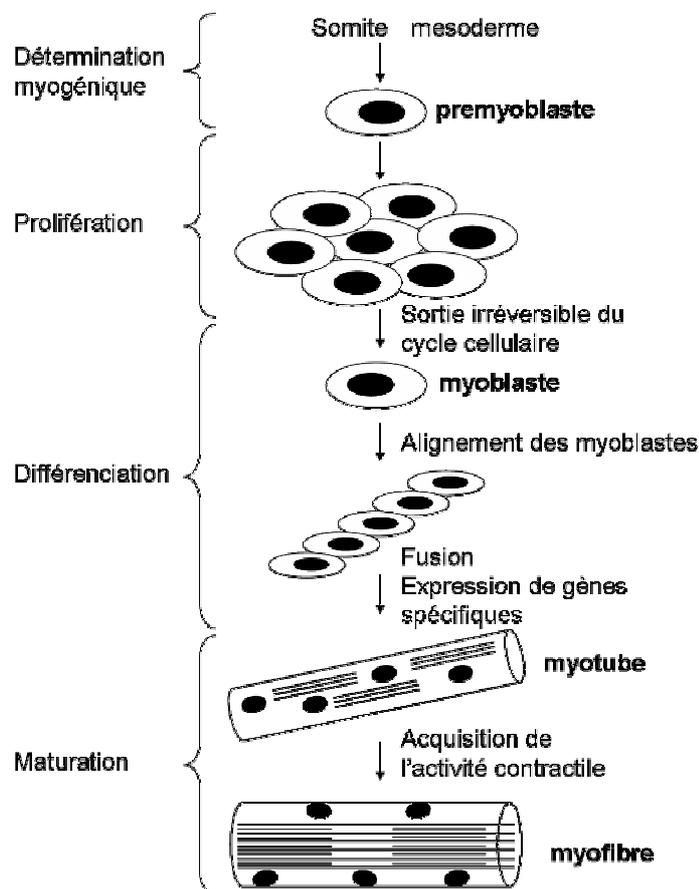


Figure 9: La myogenèse.

### III.3. L'hypertrophie

L'hypertrophie phénotypique englobe deux grands mécanismes : l'hypertrophie cellulaire qui se traduit par une augmentation du volume cellulaire, le nombre total de cellules étant inchangé et l'hyperplasie qui correspond à une augmentation du nombre de cellules, le volume cellulaire ne variant pas. L'hypertrophie peut également résulter de ces deux mécanismes combinés, hypertrophie cellulaire plus hyperplasie.

A ce jour 5 loci influençant la masse musculaire du mouton ont été identifiés. Parmi lesquels les trois plus étudiés sont la mutation "Carwell" (Rib-eye muscling), le locus "Callipyge" et le Locus "Texel Belge".

### III.3.a. Le modèle Callipyge

Le phénotype Callipyge correspond à une hypertrophie musculaire des muscles des membres pelviens. Le développement musculaire est variable en fonction des muscles et tous les muscles ne sont pas affectés.

Cette hypertrophie est le résultat d'une hypertrophie cellulaire post-natale qui se développe à partir de trois semaines après la naissance. Ces animaux présentent des caractères de boucherie intéressants tel un meilleur rendement en carcasse, un muscle *Longissimus dorsi* plus large (rôti et côtelettes) et une viande plus maigre. Le poids total des muscles du membre pelvien est supérieur de 42% au poids des muscles des individus normaux de la même fratrie. Toutefois la viande issue de ces animaux présente un défaut majeur: elle est plus dure [57], ce qui a exclu leur utilisation dans la filière bouchère.

L'expression du phénotype est associée à un SNP (Single Nucleotide Polymorphism) dans le cluster DLK1-GTL2 sur le chromosome 18. Le mécanisme d'héritabilité du phénotype a été proposé par Cockett *et al.* (1996) [58], seuls les animaux hétérozygotes ayant reçu l'allèle muté de leur père développent l'hypertrophie [59, 60]. Ce système de transmission complexe limite également son utilisation pour l'élevage d'agneaux de boucherie.

### III.3.b. La mutation Carwell

Le locus REM (Rib-Eye Muscling) est lui aussi situé sur le chromosome 18 en position distale près du locus Callipyge. Ce Locus n'affecte que la taille de noix du muscle long dorsal (*Longissimus dorsi*) d'où son nom anglais "rib-eye muscling". A l'inverse de la mutation Callipyge il n'affecte pas la tendreté de la viande et ne modifie pas le contenu en gras intramusculaire. Le locus REM responsable de cette hypertrophie du *Longissimus* est couramment appelé locus "Carwell", car les premiers animaux hyper-développés ont été décrits à Carwell Stud en Nouvelles Galles du Sud (Australie). Le gain sur le muscle est de 11% en surface et de 7% en poids.

Le locus REM agit comme une mutation dominante totale.

### III.3.c. Le modèle "Texel Belge"

Les animaux de la race "Texel Belge" présentent un hyper-développement musculaire généralisé (figure 10) [61] qui rappelle le phénotype "double-musclé" (DM) observé dans l'espèce bovine.

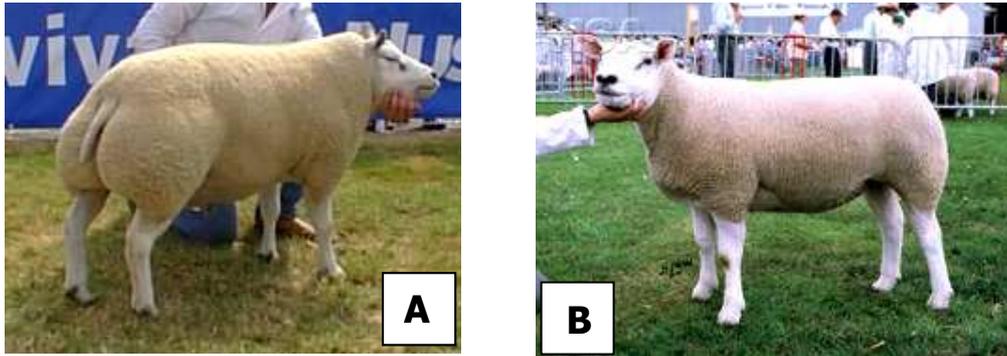


Figure 10: A:Texel Belge. [www.sheepnet.iofm.net/breeds/beltex.htm](http://www.sheepnet.iofm.net/breeds/beltex.htm).

B: Texel. [www.nationalsheep.org.uk/breeds/texel.htm](http://www.nationalsheep.org.uk/breeds/texel.htm).

Chez le bovin le phénotype DM est associé à des mutations conduisant à une perte de fonction du gène de la myostatine [62-65], un régulateur de la croissance et de la différenciation musculaire. Chez la souris K.O. pour le gène de la myostatine on observe une augmentation de la masse musculaire due à une **hypertrophie** des myoblastes, chez le bovin les mutations/inactivations de la myostatine provoquent un hyper-développement musculaire lié principalement à une **hyperplasie** des fibres musculaires [62] associée à une augmentation de la proportion de fibres musculaires de type rapide-glycolytique (IIB) et une diminution des fibres oxydatives (I). Le type musculaire glisse vers un métabolisme plus anaérobique et plus glycolytique. [66]

Le phénotype "Texel Belge" ovin, encore appelé "Texel Double-muscling" présente des caractéristiques similaires au DM bovin; L'ensemble de la musculature est affecté, l'augmentation de masse musculaire est due à une hyperplasie des fibres musculaires et l'étude des types de myosine indique un métabolisme plus glycolytique [61]. Mais ce n'est que récemment que Clop et al. (2006) [2] ont montré que les animaux Texel Belge hyper-musclés présentaient tous une mutation en 3' de la région codante du gène de la myostatine créant un site de reconnaissance par des micro-ARN (miARN) musculaires. Or lorsqu'un miARN se fixe sur sa cible, un ARN messager, il crée un complexe ARN double brin détruit par la machinerie de contrôle cellulaire qui n'autorise pas ce type de complexe ARN-ARN.

Ainsi en présence des miARN les ARN messagers de la myostatine des individus Texel sont détruits par la cellule sans que la protéine ne puisse être synthétisée, équivalant à une mutation perte de fonction du gène. Toutefois cette dégradation des ARNm de la myostatine est dépendante de l'expression des miARN, leur cinétique d'expression n'a pas encore été étudiée mais des variations dans l'expression des miARN feront varier l'expression du messager de la myostatine et donc les effets de cette dernière

sur le muscle. En absence de miARN l'expression des ARNm de la myostatine sera normale. De plus l'expression des miARN étant spécifique du muscle seul cet organe sera affecté. Ce qui n'est pas le cas dans le phénotype bovin où les différentes mutations affectent directement le produit du gène. Ainsi l'expression de ces miARN modulera l'expression du phénotype hyper-développé.

Comme dans le modèle Callipyge, l'augmentation de masse musculaire est associée à une diminution de la masse grasse et du gras intramusculaire, cependant les animaux Texel Belge conservent les aptitudes bouchères des animaux normaux et présentent donc un intérêt économique évident avec un meilleur rendement de la carcasse, une meilleure note de conformation et un engraissement moindre.

### *III.4. La Myostatine*

La Myostatine, encore appelée GDF-8 (Growth Differentiation Factor 8), appartient à la grande famille des TGF- $\beta$ , c'est un régulateur de la croissance et de la différenciation musculaire. Le gène de la myostatine est localisé sur le chromosome 2 ovin et code pour un ARNm de 3,1 Kb. Synthétisée sous forme de pré-pro-hormone (43kDa), elle est excrétée dans le milieu extracellulaire, sous forme de pro-hormone (40kDa), où elle subira alors un clivage supplémentaire avant d'être mature (12,4kDa).

La myostatine est synthétisée par le myotube en développement et dans le cytoplasme des fibres musculaires de type rapide, on la trouve associée aux chaînes lourdes de myosine (MHC) de type II [67-69]. Et plus particulièrement aux MHC de type IIA et dans les cellules les moins différenciées [70], ces cellules exprimeraient la myostatine pour inhiber leur propre prolifération. La myostatine régule négativement l'expression de MyoD (inhibiteur de la différenciation musculaire), de Myf5 et de la myogénine, favorisant ainsi la différenciation musculaire [71, 72] (figure 11). La myostatine joue un rôle dans le contrôle de la prolifération des cellules précurseurs des muscles, elle inhibe l'entrée des myoblastes en phase S du cycle cellulaire [73]. Dans la cellule myogénique la myostatine présente une localisation nucléaire [68], dans les cellules en croissance elle augmenterait l'expression de p21\* inhibant de fait l'action du complexe cdk2-Rb\* sur la prolifération cellulaire et induisant la voie de la différenciation (figure 11). Son expression augmente aussi pendant la différenciation des cellules satellites. Son mode d'interaction avec la voie de p21 reste encore à élucider. Sécrétée dans le milieu extracellulaire, elle agit de façon paracrine (locale) et sous forme dimérique en se fixant sur les récepteurs à l'activine

---

\* Protéines impliquées dans le cycle cellulaire.

de type IIB (ActRIIB) et passant par une voie de transduction impliquant la protéine Smad3. [71, 74]. (cf. figure 11) Les expériences de K.O. myostatine sur le modèle murin ont conduit à des phénotypes hyperplasiés et hypertrophiés, de même que l'activation constitutive du récepteur ActRIIB ou une surexpression du pro-peptide myostatine ou de la follistatine, un antagoniste de la myostatine. Une inactivation du récepteur ou une surexpression de myostatine entraînent, à l'inverse, une diminution de la masse musculaire. [74]

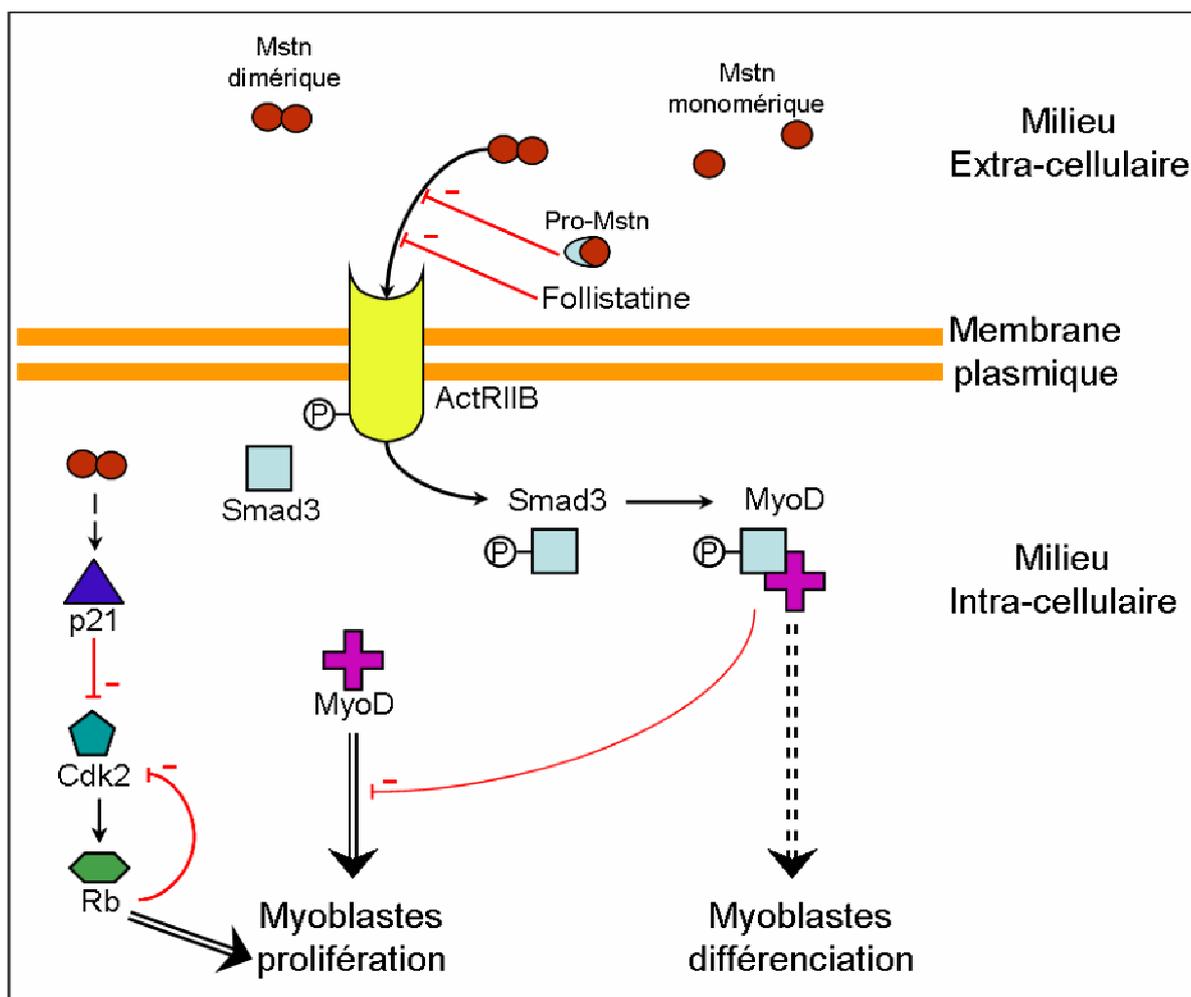


Figure 11: Schéma de régulation de la prolifération et de la différenciation des myoblastes par la myostatine (Mstn). ActRIIB: Récepteur IIB à l'activine; Ⓟ-: phosphorylation. ==> : intermédiaires mal connus. L'absence de signal de prolifération pousse la cellule dans la voie de la différenciation.

Toutefois lors de lésions musculaires elle est exprimée à la fois par les cellules non-myogéniques et les cellules myogéniques, indépendamment du type de fibre rapide ou lent, après les premières étapes de régénération, elle joue un rôle de contrôle de la masse cellulaire suivant l'hypothèse des Chalones [67, 75]. Selon cette hypothèse la masse musculaire après régénération ne dépassera jamais la masse initiale. Dans le muscle la myostatine remplit toutes les conditions des Chalones, une Chalone étant un régulateur négatif produit par un tissu pour inhiber sa propre croissance.

# CHAPITRE II. METHODES D'ETUDES DU PROTEOME ET DU TRANSCRIPTOME.

## I. LE PROTEOME

Le protéome est l'ensemble des protéines exprimées dans une cellule, un tissu, à un temps donné. Sa composition varie en fonction du temps et des stimuli extérieurs. Les études de protéomique ont pour but de caractériser et de décrire ce protéome, cette caractérisation est dépendante du mode d'échantillonnage et des techniques utilisées. De nombreuses techniques permettent d'étudier un point précis du protéome. Ainsi l'électrophorèse monodimensionnelle (1-D) permet de mettre en évidence des variations d'isoformes de protéines, mais est limitée par le nombre de protéines visualisables sur un gel et doit souvent être associée à des expériences de Western Blot pour permettre de suivre une protéine en particulier; c'est donc une technique bien adaptée à l'étude de protéines connues et caractérisées. Sont également utilisées les techniques de révélation ELISA et les colonnes de purification. L'électrophorèse bidimensionnelle est à l'heure actuelle la technique qui permet la visualisation la plus globale du protéome. Des techniques basées sur la spectrométrie de masse se développent pour offrir une alternative à l'électrophorèse 2-D (ex: SELDI, Surface Enhanced Laser Desorption/Ionisation). L'électrophorèse 2-D, couplée le plus souvent à des techniques d'identification protéiques en spectrométrie de masse, a deux utilisations majeures: d'une part la caractérisation globale du protéome d'un tissu et la création de véritables "cartes" protéiques et d'autre part la comparaison de deux états donnés, pathologiques ou non, tel l'étude de cancers (tissu sain vs malade), de facteurs génétiques (comparaison de l'effet d'un génotype) et aussi l'étude de l'effet d'un stimulus sur un tissu (variation de l'alimentation, de la température, du stress...).

Ainsi l'électrophorèse 2-D semble une technique particulièrement adaptée pour l'observation globale des protéomes et sous-protéomes de deux génotypes et pour leur comparaison. Associée aux techniques d'identification des protéines par spectrométrie de masse elle nous permet d'intégrer les modifications du protéome dans les voies métaboliques et cellulaires.

### *I.1. L'électrophorèse bi-dimensionnelle*

L'électrophorèse 2-D consiste à séparer les protéines d'un échantillon, dans un premier temps, en fonction de leur point isoélectrique ( $pI$ ), c'est l'étape d'iso-électro-focalisation (IEF) et dans un deuxième temps en fonction de leur masse moléculaire ( $M_w$ ).

### I.1.a. Première dimension ou iso-électro-focalisation

Les protéines sont des molécules amphotères, et leur charge nette varie selon le pH de la solution dans laquelle elles se trouvent. La focalisation électrique sépare les protéines suivant leur point isoélectrique (pI). Le pI correspond au pH où la charge nette de la protéine est égale à zéro. Ainsi les protéines sont chargées positivement aux pH inférieurs à leur pI et négativement aux pH supérieurs. Lorsque dans un gradient de pH on les soumet à l'influence d'un champ électrique les protéines chargées positivement migrent vers la cathode en perdant, au fur et à mesure, leurs charges positives pour se stabiliser lorsque leur charge nette est nulle, c'est à dire lorsqu'elles atteignent leur pI. De la même façon, les protéines chargées négativement migrent vers l'anode en perdant des charges négatives, jusqu'à leur point isoélectrique (Figure 12).

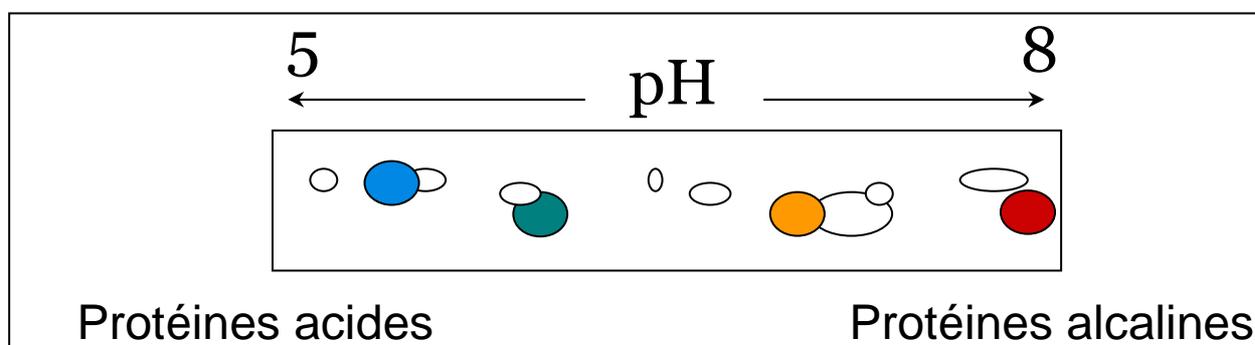


Figure 12: Représentation schématique de l'IEF. Migration des protéines dans le gel jusqu'à leur point isoélectrique (pI) sous l'effet d'un courant électrique.

Il existe de nombreux gradients de pH commercialisés et couvrant toutes les zones de pH, des zones élargies avec les gradients larges (3-10 linéaires ou non), et restreints avec des gradients couvrant trois (4-7, 5-8, 7-11...) voire une unité pH (4,7-5,9 ; 5,3-6,5 ; 6,2-7,5...). Plus les gradients sont restreints, meilleure est la résolution des gels mais plus la fenêtre de visualisation est petite.

### I.1.b. Deuxième dimension ou électrophorèse en gel de Polyacrylamide dénaturante (SDS-PAGE)

Le gel d'IEF doit être équilibré avant d'être placé sur le gel de 2ème dimension dans une solution contenant du Sodium Dodécyl Sulfate (SDS). Le SDS est un agent anionique qui se fixe sur les protéines. Il masque la charge propre des protéines en formant un complexe ayant une charge nette négative. Le SDS rompt les ponts hydrogènes, bloque les interactions hydrophobes, et déplie partiellement les protéines. Les protéines sont totalement dépliées et réduites par addition de Dithiothréitol (DTT) et alkylées par addition d'iodoacétamide (étape

d'équilibration). La migration des protéines dans le gel d'acrylamide n'est alors pas déterminée par les charges électriques des protéines, toutes identiques, mais par leur masse moléculaire (Mw). La distance de migration du polypeptide chargé négativement (SDS) est proportionnelle au logarithme de son poids moléculaire et varie en fonction de la concentration en polyacrylamide du gel, exactement comme pour une électrophorèse monodimensionnelle en conditions dénaturantes. Les protéines sont ainsi transférées des strips d'IEF au gel d'électrophorèse et migrent dans une 2<sup>ème</sup> dimension (figure 13).

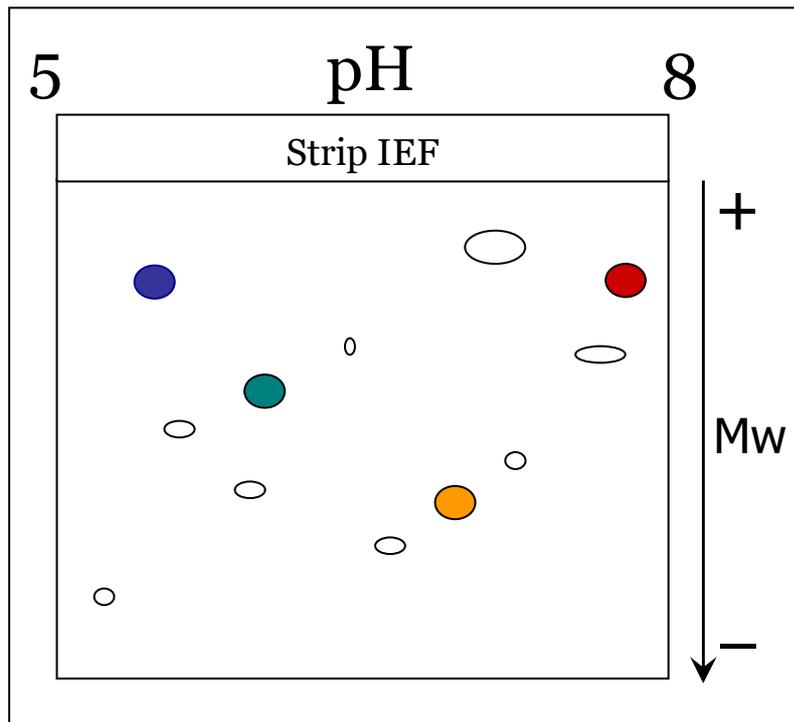


Figure 13: Représentation schématique de la migration en 2<sup>ème</sup> dimension. Les protéines migrent dans le gel dénaturant en fonction de leur masse moléculaire (Mw).

### I.1.c. Les limites de l'électrophorèse 2D

Plusieurs cartes protéiques sont nécessaires pour étudier la totalité du protéome d'un tissu. Etant donné que le pouvoir de résolution de l'IEF est favorisé par des gradients de pH étroits, il faut réaliser des cartes protéiques regroupant les protéines par gamme de points isoélectriques. De plus, sur les gels d'électrophorèse il est impossible d'observer en même temps des protéines de poids moléculaire (PM) inférieurs à 10 kDa et supérieurs à 90 kDa. Les protéines de PM inférieurs à 10 kDa sont trop petites et sortent du gel avant le témoin de migration (Bleu de Bromophénol) et les protéines de plus de 100 kDa sont trop volumineuses et ont du mal à pénétrer le gel de polyacrylamide, elles restent dans la partie supérieure du gel, mal résolues. L'électrophorèse bidimensionnelle est une méthode séparative très performante (entre 10 et 90 kDa) mais il reste vrai que de nombreuses protéines, notamment membranaires, restent insolubles ou faiblement solubles, ce qui rend leur séparation en deux dimensions aléatoire voire impossible. Sans oublier que de nombreuses protéines faiblement exprimées ne sont pas toujours visualisables en fonction de la coloration utilisée et qu'elles peuvent être masquées par l'abondance des protéines majoritaires. Pour pallier ce problème on peut alors choisir d'extraire préférentiellement les protéines d'un compartiment cellulaire ou bien d'extraire un type de protéines en s'appuyant sur leurs propriétés physico-chimiques.

### *I.2. L'extraction fractionnée*

Le protéome tissulaire est extrêmement complexe et une étude basée sur des "extraits totaux" ne pourra mettre en évidence que les variations des protéines présentes en grand nombre de copies. Les protéines faiblement représentées ne pourront pas être étudiées. Pour bien étudier un tissu il faut en réduire la complexité, les méthodes de fractionnement cellulaire sont des techniques simples pour enrichir la fraction d'étude en protéines à faible nombre de copies [76-77].

Le muscle contient 50% de protéines myofibrillaires (myosine, tropomyosine, actine), 20% de protéines stromales (collagènes, fibrine,...) et 30% de protéines sarcoplasmiques (enzymes, chaperonnes, transporteurs,...). Les protéines sarcoplasmiques sont, par essence, des protéines solubles, il suffit donc d'utiliser des tampons de faible force ionique pour les extraire [78]. La figure **14** présente trois gels réalisés à partir d'extrait total de muscle et des deux fractions obtenues lors de l'extraction fractionnée. On observe deux profils distincts (sarcoplasmique et myofibrillaire) présentant un enrichissement notable en protéines de la fraction étudiée. Cette technique permet d'étudier dans la fraction sarcoplasmique les protéines plus faiblement représentées qui sinon auraient été masquées par l'abondance de protéines myofibrillaires.

La méthode de fractionnement augmente le taux de sels, il faut donc maximiser la solubilité des polypeptides afin de favoriser leur pénétration dans le gel. Des agents réducteurs (dithiothréitol, tributylphosphine,...) et des anti-protéases (ici Pefabloc, amersham) sont ajoutés au tampon d'extraction pour conserver l'intégrité des polypeptides et éviter les modifications de pI (carbamylation, complexation avec des phénols) et les dégradations (protéases).

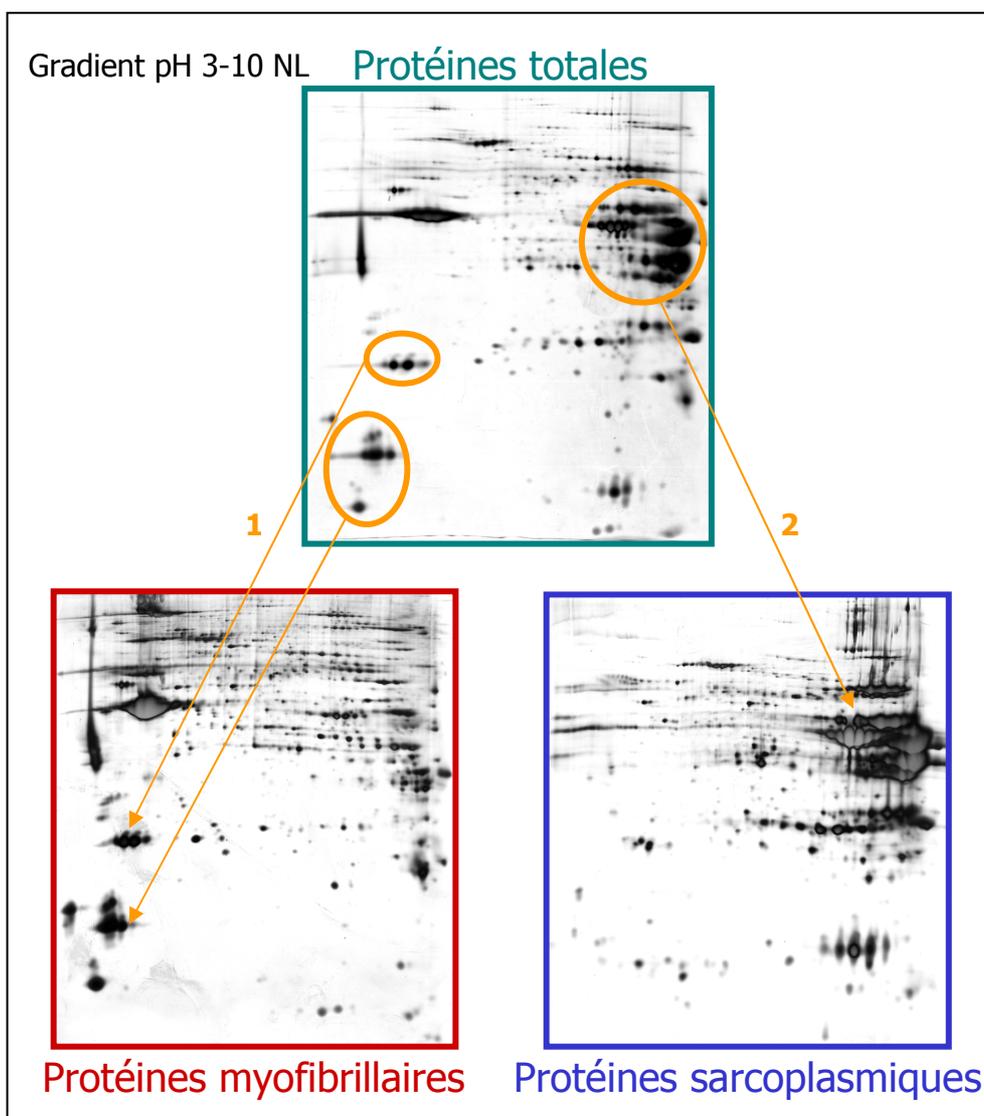


Figure 14: Migration en électrophorèse bidimensionnelle des différentes fractions. Migrations obtenues, pour un dépôt protéique de même quantité (90 µg), coloration au nitrate d'argent: extrait total (vert); fraction myofibrillaire (rouge); fraction sarcoplasmique (bleu). 1: protéines myofibrillaires (chaînes de myosines); 2: protéines sarcoplasmiques (kinases).

### *1.3. Visualisation des protéines*

Il existe de nombreuses méthodes pour révéler les protéines présentes sur les gels (Bleu de Coomassie, Rouge Ponceau, nitrate d'argent, fluorochromes, radioactivité). Elles présentent toutes des avantages et des inconvénients. Par exemple, la gamme de détection du Bleu de Coomassie (bleu colloïdal G250) permet de révéler des spots protéiques dont la quantité

minimale est de 10ng, la coloration au nitrate d'argent et les fluorochromes permettent de descendre le seuil à 1ng, seules les techniques de radioactivité permettent d'abaisser le seuil de détection en dessous du nanogramme ( $P^{32}$ ,  $S^{35}$ ). La radioactivité permet une détection très fine mais elle est également assez coûteuse et présente plus de risques pour le manipulateur. La fluorescence est aussi une technique onéreuse. La coloration au bleu de Coomassie est moins lourde à mettre en œuvre que celle au nitrate d'argent, elle pose moins de problèmes lors des tentatives d'identification en spectrométrie de masse et permet de charger de grandes quantités de protéines (de 400 à 1000  $\mu\text{g}$  au bleu et de 50 à 300  $\mu\text{g}$  à l'argent) mais elle est moins résolutive.

#### *1.4. Spectrométrie de masse et Identification protéique*

L'empreinte peptidique massique est à l'heure actuelle la technique de choix pour l'identification de protéines, elle a détrôné le séquençage d'Edman. La protéine inconnue est digérée par une enzyme (trypsine, endopeptidase,...) et le mélange peptidique obtenu est analysé en spectrométrie de masse, les masses peptidiques mesurées sont ensuite confrontées aux bases de données à l'aide de l'outil informatique.

La technologie MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) permet la mesure de masses allant de quelques acides aminés à 150 kDa, elle utilise un faisceau laser pulsé travaillant dans l'UV pour désorber et ioniser le mélange matrice-échantillon co-cristallisé sur une surface métallique. Pour préparer le cristal il suffit de déposer une goutte du mélange peptidique et de le recouvrir d'une goutte de matrice (la plus utilisée étant l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique) et de laisser sécher à l'air libre. La matrice est en excès par rapport à l'échantillon, lorsque le laser frappe la surface du cristal, l'énergie qu'il transmet est absorbée par la matrice qui passe en phase gazeuse entraînant l'échantillon. Il y a alors ionisation de l'échantillon, les peptides ionisés sont accélérés vers l'analyseur par application d'un champ électrostatique. Cette technique est généralement couplée à un analyseur de type "Temps de Vol" (TOF, Time Of Flight). Ces analyseurs TOF mesurent le rapport  $m/z$  (masse/charge) d'un peptide ionisé en déterminant le temps de vol dans la chambre entre la cible et le détecteur. Plus le rapport  $m/z$  sera petit plus le temps de vol sera court. L'ensemble des peptides ionisés détectés constitue l'empreinte peptidique massique, elle est spécifique de la protéine inconnue que l'on désire identifier.

Il faut alors comparer cette empreinte expérimentale aux empreintes théoriques générées *in silico* de milliers de protéines dans les différentes bases de données; des programmes informatiques tel Mascot (<http://www.matrixscience.com>) et Profound (<http://prowl.rockefeller.edu>) permettent d'automatiser cette recherche.

Il est possible d'obtenir des informations de séquence à l'aide de spectromètre de masse en mode tandem (ou MS/MS) comme ceux de type ESI-MS/MS (ESI: Electron Spray Ionisation)

et Q-TOF-MS/MS (Quadrupole-TOF). Le fonctionnement d'un spectromètre de masse ESI-MS/MS est décrit sur le site Web du centre de biophysique moléculaire du CNRS à Orléans (<http://rosalie.cnrs-orleans.fr/~webcbm/Masseesi.htm>).

En général, les peptides de l'empreinte permettent de couvrir 20 à 40% de la séquence totale de la protéine identifiée. Toutefois, si la protéine de départ possède une masse supérieure à 100kDa il n'est pas rare d'obtenir des scores de recouvrement entre 5 et 10%. Plus la protéine est grande plus il y a de résidus et plus le recouvrement est faible. Un autre facteur jouant sur l'identification est le degré de séquençage du génome de l'organisme étudié, car les empreintes théoriques sont générées à partir des bases de données nucléotidiques issues du séquençage des génomes. Pour un organisme dont le génome est encore peu avancé il sera difficile d'identifier les protéines dans l'espèce étudiée. Cependant, il est possible d'identifier des protéines homologues dans d'autres organismes proches dont le génome est beaucoup plus avancé. Chez les mammifères on pourra identifier des protéines par leurs homologues chez l'homme (*Homo sapiens*) ou la souris (*Mus musculus*). Lors d'identification de protéines chez le mouton (*Ovis aries*) on pourra ainsi identifier des protéines humaines, murines, et surtout bovines, les bases de données bovines étant plus développées que les bases ovines. Le pourcentage de recouvrement sur ces protéines homologues sera évidemment plus faible puisque la substitution d'un seul acide aminé empêchera l'identification du peptide comme faisant partie de l'empreinte théorique (Annexe I).

### *1.5. Technique de SELDI-TOF*

La technique SELDI-TOF est une technique de spectrométrie de masse basée sur le sous fractionnement de l'échantillon directement sur la cible du spectromètre. L'appareil de masse utilisé est un SELDI-TOF (Surface Enhanced Laser Desorption Ionisation Time Of Flight). La technologie utilisée par cet appareil est basée sur celle du MALDI-TOF (voir paragraphe I.4) : l'ionisation s'effectue sur une cible à l'aide d'un laser après dépôt de l'échantillon et d'une matrice. Ce spectromètre est utilisé pour l'étude de protéines de faible poids moléculaire en mode linéaire. La différence principale repose sur le support (cible) du SELDI-TOF qui possède une surface chimiquement active. Différentes chimies de surface sont disponibles permettant de séparer les protéines selon une de leurs propriétés :

- Leur pI : surfaces échangeuses de cations (CM10) ou d'anions (Q10).
- Leur hydrophobicité : surface d'échange en phase inverse (H50) ou en phase normale (NP20).
- Leur affinité pour le métal (IMAC30)

Le fractionnement de l'échantillon protéique est ainsi directement réalisé sur la cible suivant un protocole adapté à la technique séparative choisie (exemple figure 15).

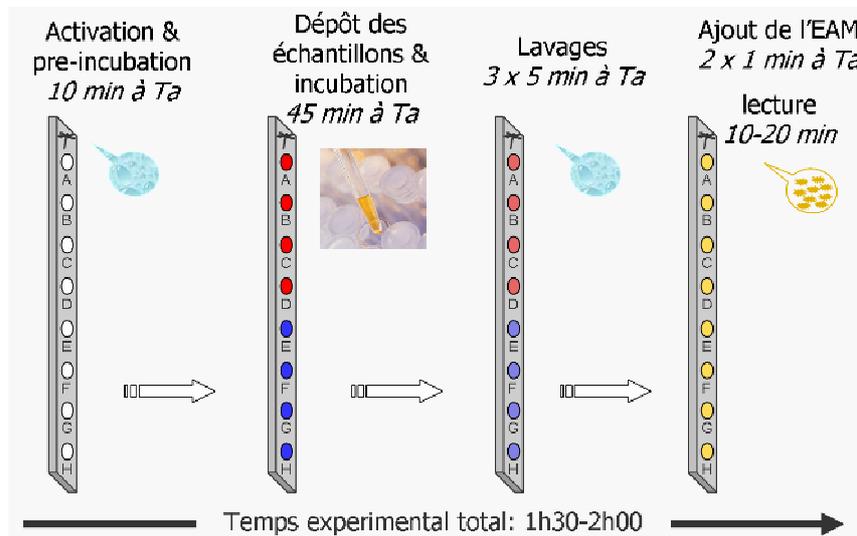


Figure 15: Protocole SELDI. 5µg de protéines totales d'échantillon ont été déposés

Une fois le fractionnement réalisé une matrice est déposée sur la cible et après excitation par un laser, un profil protéique massique est obtenu (Figure 16).

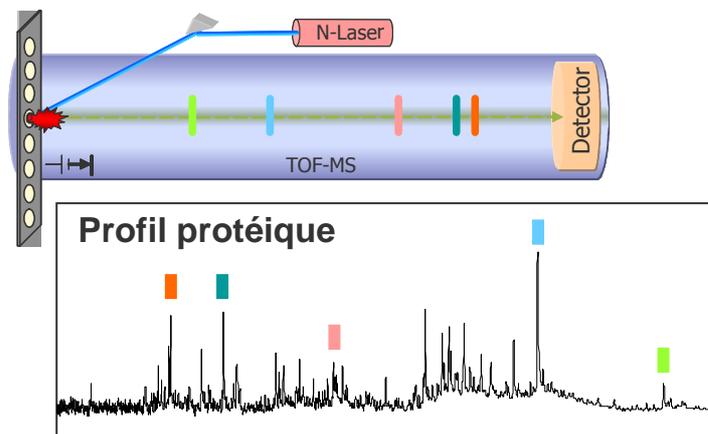


Figure 16: Les protéines ionisées sont détectées et leur masses estimées sur leur temps de vol.

Ces profils sont ensuite comparés pour tous les échantillons de l'analyse. La différence entre les groupes à comparer est ensuite réalisée pour chaque pic de masse obtenu sur leur intensité. Cette technique rapide permet donc d'analyser un grand nombre d'échantillons avec différentes possibilités de fractionnement. L'un des problèmes majeurs reste l'identification du pic protéique montrant une différence inter groupe. Pour identifier les protéines d'intérêt, il est alors nécessaire d'utiliser des micro-colonnes possédant les mêmes propriétés chimiques que la barrette utilisée. Le groupe de protéines ainsi purifiées sera ensuite passé sur gel SDS-PAGE. La bande correspondant au poids moléculaire estimé lors du tir SELDI sera prélevée et identifiée en spectrométrie de masse MALDI-TOF ou ESI-MS/MS.

## II. LE TRANSCRIPTOME

Le transcriptome est l'ensemble des ARN messagers (ARNm) exprimés dans une cellule, un tissu, à un temps donné. Sa composition, comme celle du protéome, varie en fonction du temps et des stimuli extérieurs. Les études de transcriptomique ont pour but de caractériser et de décrire le transcriptome, elles s'appuient sur des techniques de microarray (criblage) et de quantification des ARNm. Les microarray (micro-réseaux) permettent de visualiser l'expression de plus de 25000 gènes en une seule expérience et ainsi de comparer différents états. Cependant ils sont dépendants de la connaissance du génome de l'espèce étudiée. Bien que l'on puisse réaliser des analyses hétérologues [79] et hybrider des ARNm d'une espèce sur des puces ADN d'une autre espèce suffisamment proche, ces analyses inter-espèces ne constituent qu'une étape préliminaire qu'il faudra ensuite affiner avec une puce dédiée spécifiquement à l'espèce étudiée. On peut également étudier le transcriptome sans connaître les gènes. Il faut alors créer aléatoirement toutes les sondes possibles et lorsqu'une différence d'expression est détectée se focaliser sur le gène correspondant pour l'identifier, tout comme en électrophorèse bidimensionnelle où une fois le spot variant détecté il faut encore l'identifier par des méthodes complémentaires.

Il existe des techniques de quantification des ARNm plus précises mais qui ne s'appliquent pas à une analyse globale du transcriptome. Elles s'attachent à décrire l'expression des ARNm d'un gène en fonction des conditions d'expérimentation. La cible doit être connue pour pouvoir créer la sonde qui révélera spécifiquement l'ARNm que l'on souhaite étudier. Les premières techniques de quantification du transcriptome faisaient appel aux gels d'électrophorèse et à la radioactivité pour quantifier les ARNm (Northern Blot). Depuis les techniques de quantification dites de "PCR en temps-réel" basées sur la fluorescence se sont développées et permettent une analyse très fine des différences d'expression. Cette technique est bien adaptée pour travailler sur un nombre de gènes restreint.

Enfin, le transcriptome n'est pas une justification du protéome, il ne fait qu'apporter une information complémentaire pour la compréhension des mécanismes sous-jacents de régulation de l'expression des phénotypes.

### *II.1. La transcription inverse*

Pour analyser le transcriptome il faut extraire les ARNm d'un tissu et procéder à une transcription inverse. L'ensemble des ARN sont copiés sous forme ADN simple brin pour pouvoir être ensuite amplifiés par PCR (Polymerase Chain Reaction). Ces ADN simple brin sont appelés ADN complémentaires (ADNc). Cette étape conservative (pour une molécule d'ARN on obtiendra une molécule d'ADNc) est réalisée par une Transcriptase inverse.

Il existe plusieurs types d'ARN dans la cellule dont les ARNt (ARN de transfert) chargés d'apporter l'acide aminé correspondant, les ARNr (ARN ribosomiaux) qui participent à la structure des ribosomes et encore de nombreux autres ARN parmi lesquels les ARNm (ARN messager) se distinguent par la présence d'une succession d'adénine à leur extrémité 3' (Queue PolyA). La transcription réalisée à l'aide d'amorces de types hexamères aléatoires permet de rétro-transcrire les ARN totaux et pas uniquement les messagers porteurs d'une queue polyA. Les quantités d'ARN rétrotranscrits sont dépendantes de la quantité d'ARN extrait.

## *II.2. Amplification PCR-temps réel*

Il existe de nombreuses méthodes pour quantifier l'expression des ARNm en temps réel, elles sont toutes basées sur une mesure de fluorescence à un instant donné du cycle de PCR. Certaines utilisent des sondes fluorescentes spécifiques du gène étudié (système TaqMan) et d'autres l'insertion d'un intercalant fluorescent de l'ADN double brin (système SYBRgreen). Avec la technique TaqMan, pour chaque gène étudié en plus des amorces d'amplification il faut créer une sonde spécifique. L'intercalant a l'avantage de s'appliquer à tous les gènes, du moment que les amorces d'amplification leur sont spécifiques.

Ainsi, comme pour toute PCR, la PCR en temps réel nécessite un couple d'amorces spécifiques du gène dont on souhaite étudier l'expression. On sélectionne une amorce sens et une amorce anti-sens, chacune d'une vingtaine de bases, et permettant d'amplifier des fragments ADN allant de 70 à 140 bp (paires de base) avec une température de fusion proche de 60°C. Lors de cette sélection les amorces ne doivent pas être trop riches en bases répétées et en paire Guanine-Cytosine.

Pour suivre en temps réel, c'est-à-dire à chaque cycle de PCR, la quantité d'ADN synthétisé on ajoute au mélange de la réaction PCR un agent intercalant, le SYBR-green, qui fluoresce une fois qu'il est intercalé dans l'ADN double brin (Figure 17). Ainsi plus il y a d'ADN double brin plus la fluorescence sera élevée, à chaque cycle de PCR la quantité d'ADN double ce qui se traduit par l'augmentation de la fluorescence.

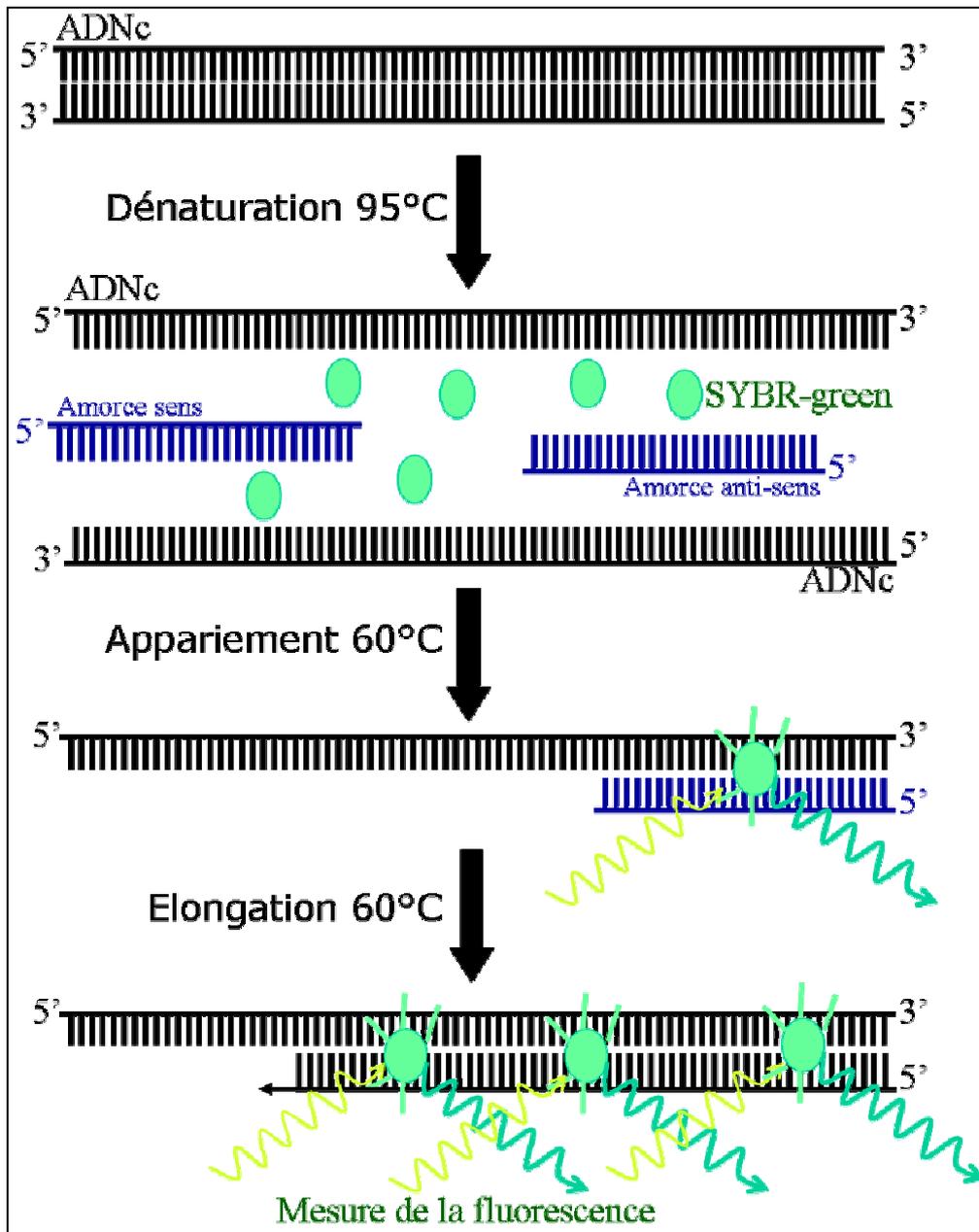


Figure 17: Etapes schématiques de la PCR en temps réel.

Si l'on souhaite comparer la quantité d'ADNc, donc d'ARN, d'un gène entre deux échantillons il suffit de mesurer l'intensité de fluorescence à un instant donné, l'échantillon le plus riche en ADNc aura l'intensité la plus forte. Ainsi, à partir des cinétiques de fluorescence obtenues lors de l'amplification, une valeur seuil est définie, pour que l'ensemble des échantillons soit en phase exponentielle d'amplification (Figure 18). On détermine alors le cycle correspondant à l'intersection entre la droite seuil et la cinétique de chaque échantillon. Ce cycle est appelé cycle seuil (Ct) (Figure 18 et 19).

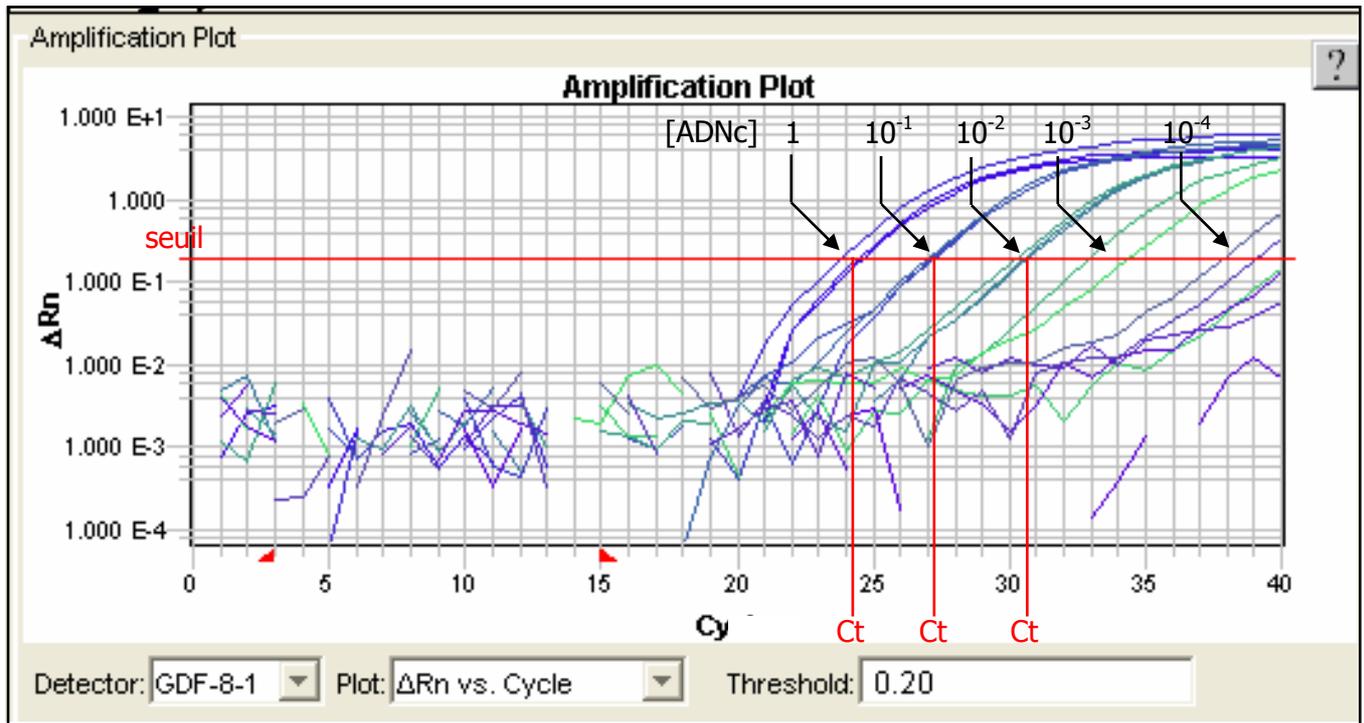


Figure 18: Amplification des ADNc de la myostatine (GDF-8). Différentes dilutions d'ADNc totaux sont utilisées: non-dilué (1), au dixième ( $10^{-1}$ ), au centième ( $10^{-2}$ ), au millième ( $10^{-3}$ ) ainsi qu'au dix millième ( $10^{-4}$ ) et au cent millième ( $10^{-5}$ ).

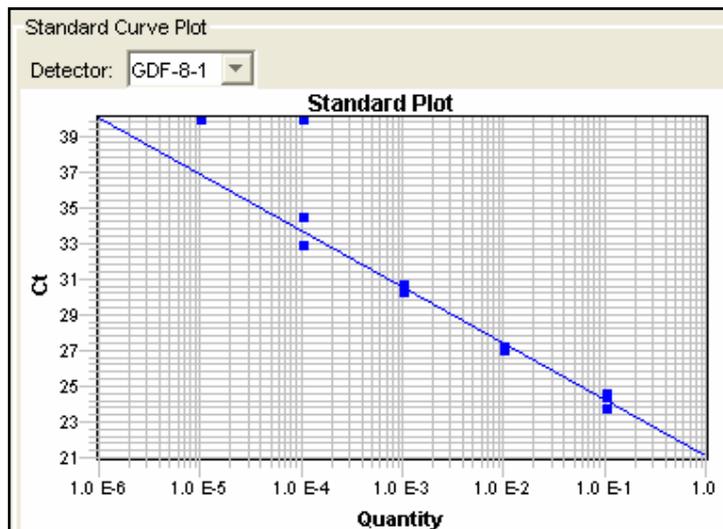


Figure 19: Courbe standard. Cette courbe permet de déterminer l'intervalle de fiabilité de l'amplification. Ici au-delà de la dilution  $10^{-3}$  l'amplification n'est plus spécifique. Il faudra donc s'assurer que les quantités d'ADNc ne soient pas en dessous de ce seuil.

### II.3. Gènes rapporteurs et méthodes de comparaison

La quantité d'ARNm total peut être variable d'un individu à l'autre, on utilise donc des gènes rapporteurs. Ces gènes rapporteurs sont des gènes dont l'expression est considérée comme invariante d'un individu à l'autre. Ils servent comme point de référence fixe pour la quantification du gène d'intérêt.

# CHAPITRE III. MATERIEL ET METHODES

## I. MATERIEL :

### *I.1. Animaux*

Les agneaux que nous avons utilisés sont issus de la génération F2 d'un croisement entre des brebis de race Romanov et des béliers double-musclés de race Texel Belge.

Les animaux sont génotypés sur deux marqueurs flanquants du gène de la myostatine [61]. Nous avons ainsi déterminé 3 génotypes différents: le génotype homozygote Romanov (RR) ayant hérité de l'allèle Romanov sur ses deux chromosomes, le génotype homozygote Texel (TT) ayant hérité de 2 allèles Texel et le génotype hétérozygote (RT ou TR) ayant hérité des 2 allèles parentaux. Nous avons choisi de travailler sur la F2 pour atténuer l'effet du fond génétique sur le génotype observé. En effet, les animaux Romanov et Texel Belge pure race présentent une différence de conformation majeure. Dans le Classement EUROP (échelle de notation des carcasses) on observe 4 notes d'écart. Les animaux F2 TT et RR ne présentent plus que 0,7 note de différence, mais cette différence de note est suffisante pour déterminer l'effet de la mutation Texel Belge hyper-musclé. Nos études ont été réalisées sur des muscles provenant d'animaux sub-adultes âgés de trois mois et sur des muscles foétaux.

Les agneaux âgés de 3 mois (15 TT, 17 RR et 6 RT) sont abattus à poids fixes, 33 kg pour les femelles et 39 kg pour les mâles correspondants aux poids commerciaux d'abattage. Après l'abattage les carcasses sont pesées puis découpées suivant les pratiques commerciales. Les muscles dédiés aux études protéomiques et transcriptomiques ont été pesés individuellement. Ces muscles (*Longissimus dorsi*, *Semimembranosus*, *Vastus medialis* et *Tensor fasciae latae*) ont été choisis en fonction de leurs types métaboliques et contractiles (type de myosine; Cf. Tableau 3), de leur développement chez les individus TT et de leur emplacement sur la carcasse.

	Type de Myosine		
	MHC I	MHC IIa	MHC IIb
SM	13	11	76
LD	8	21	71
TL	7	17	76
VM	34	14	52

**Tableau 3:** Type contractile; pourcentage des différents types de chaîne lourde de myosine. (T. Sayd, communication personnelle).

Le *Longissimus dorsi* (LD) et le *Semimembranosus* (SM) sont des muscles habituellement classés dans la catégorie Rouge à contraction rapide, le *Tensor fasciae latae* (TL) est lui un muscle Blanc à contraction rapide et le *Vastus medialis* (VM) est un muscle Rouge à contraction lente. Le VM, le SM et le TL sont tout les trois des muscles de la cuisse, quant au LD c'est un muscle du dos souvent utilisé comme modèle (figure 20).

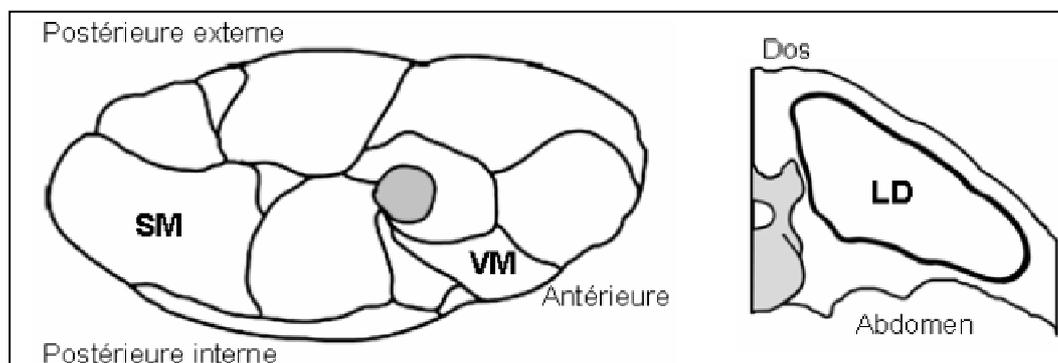


Figure 20. Coupes transversales de la cuisse et du dos, situant les muscles *semimembranosus* (SM), *vastus medialis* (VM) et *longissimus dorsi* (LD). L'os est en grisé.

Les poids des muscles mesurés après dissection indiquent que le SM, le LD et le TL des animaux homozygotes TT présentent un taux d'hypertrophie respectivement de 16%, 17,5% et 18,6% par rapport aux muscles des homozygotes RR. Le VM quant à lui n'est pas hyper-développé. (E. Laville, communication personnelle).

Pour l'analyse du protéome en électrophorèse bidimensionnelle et pour l'étude histologique nous avons choisi de travailler sur les 2 génotypes extrêmes: homozygotes RR et TT.

Les échantillons prélevés pour les typages histochimiques (15TT et 17RR) ont été prélevés dans la partie centrale des muscles dans les 30 minutes suivant l'abattage. Ils ont été congelés dans de l'isopentane refroidi par l'azote liquide et stockés à -80°C.

Les échantillons destinés à l'étude protéomique ont été prélevés dans la partie centrale des muscles dans les 30 minutes suivant l'abattage. Parmi les 15 TT et 17 RR abattus cinq agneaux homozygotes TT et cinq agneaux homozygotes RR ont été étudiés (sauf pour le *vastus medialis*, 4 agneaux par génotype). Les animaux ont été sélectionnés au hasard en respectant le sexe ratio (n° des animaux cf. Annexe I). Ils ont été congelés dans l'azote liquide, puis réduits en poudre à l'aide d'un mortier et d'un pilon mécanique, avant d'être stockés à -80°C.

Les échantillons destinés au transcriptome ont été prélevés dans la partie centrale des muscles SM et VM dans les 30 minutes suivant l'abattage. Tous les agneaux de chacun des 3 génotypes ont été prélevés (SM: 15 TT, 17 RR 6 RT et VM: 9 RR et 4 TT). Ils ont été congelés dans l'azote liquide et stockés à -80°C.

Pour les analyses de transcriptome nous avons souhaité étudier l'expression de certains gènes non seulement à l'âge d'abattage de 3 mois mais également à des stades plus précoces au cours du développement musculaire embryonnaire, pendant la phase de prolifération des myofibres où s'expriment les gènes régulateurs.

Des brebis gestantes F1 ont été sacrifiées. Les fœtus ont été prélevés et sacrifiés. Au moment du sacrifice le génotype des fœtus n'est pas connu. Nous avons donc effectué des prélèvements des muscles postérieurs de la cuisse sur des fœtus de 50 jours (11 fœtus), 70 jours (14 fœtus) et 90 jours (15 fœtus). Ces stades ont été choisis par analogie avec les stades de développement musculaire bovin pour encadrer la période de prolifération du tissu musculaire. Les échantillons ont été prélevés immédiatement après sacrifice, congelés dans l'azote liquide et stockés à -80°C.

## II. METHODES

### *II.1. Histologie*

Des cryo-sections transversales successives de 10 µm d'épaisseur ont été réalisées selon la méthode décrite par Sayd et al. (1998) [80]. Une première section est marquée par la technique de la myosine-ATPase après une pré-incubation à pH 4,45 permettant de distinguer 3 types de fibres: I, IIA et IIB [81]. La section suivante est marquée par la technique de la Succinate déshydrogénase [82], cette coloration différencie 2 types de fibres au sein des IIB, les IIB présentant une activité oxydative (IIBo) et les IIB présentant une activité oxydative moindre (IIBno). Les typages ont été réalisés sur une moyenne de 300 fibres.

### *II.2. Protéome*

#### II.2.a. Extraction fractionnée

Pour bien étudier un tissu il faut en réduire la complexité, les méthodes de fractionnement cellulaire sont des techniques simples pour enrichir la fraction d'étude en protéines à faible nombre de copies [77-79].

Des modifications du protéome myofibrillaire ont déjà été décrites dans l'hypertrophie musculaire Texel. Notre but était donc d'étudier le protéome sarcoplasmique en s'affranchissant de la masse de protéines myofibrillaires. Nous voulions observer les modifications possibles de l'expression des enzymes du métabolisme et des protéines de signalisation présentes en plus faible quantité que les protéines myofibrillaires dans les extraits de muscle totaux.

Nous avons donc extrait les protéines par une technique de fractionnement cellulaire dérivée de celle décrite par Pietrzak et al. (1997) [78].

The extraction buffer consisted of 50 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris, 2 mM EDTA, 1% (w/v) DTT and 5 mM Pefabloc at pH7. Muscle samples (150 mg) were added to 1.5 mL of extraction buffer in an Eppendorf tube containing a glass bead. Homogenization was performed in a Retsch MM2 ball mill (Retsch, Haan, Germany) for 1 h at 4°C. Extracts were centrifuged at 10,000 g for 15 min at 6°C and the supernatant was collected. Samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

### II.2.b. Électrophorèse bidimensionnelle

Immobilised pH gradient (IPG) isoelectric focusing (IEF) was carried out in a Protean IEF cell (Bio-Rad; Hercules, CA, USA), using Bio-Rad ReadyStrip, 17 cm, pH5-8. Proteins were loaded onto the strips for analytical (110 µg) or preparative gels (300 µg). Proteins were loaded by inclusion of an adequate volume of extract in a buffer consisting of 7 M urea, 2 M thiourea, 2% (w/v) CHAPS, 5 mM Pefabloc, 0.2% (w/v) DTT and 0.2% carrier ampholytes. The strips were rehydrated overnight. For the subsequent IEF, voltage was increased gradually to 8,000 V until a total of 80,000 Vh. The strips were immediately frozen and stored at -20°C until further use. Before sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel Electrophoresis (SDS-PAGE), the strips were equilibrated for 15 min followed by a further 20 min in a solution of 6 M urea, 30% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS and 50 mM Tris successively supplemented with 1% (w/v) DTT or 2.5% (w/v) iodoacetamide and bromophenol blue as a dye. SDS-PAGE was performed in a protean Ixi cell (Bio-Rad) on 12% polyacrylamide gels at 15 mA per gel until the dye track reached the end of the gels.

### II.2.c. Visualisation des protéines

Les quantités de sels présentes dans nos fractions ne nous permettaient pas de charger suffisamment nos gels pour employer la technique de coloration au Bleu de Coomassie. Il nous est apparu que la coloration au nitrate d'argent nous permettrait de visualiser un maximum de protéines et d'avoir ainsi une vue du protéome sarcoplasmique la plus large possible. Nous nous sommes donc basés sur la technique de coloration à l'argent décrite par Yan et al. (2000) [83] adaptée à l'analyse en spectrométrie de masse.

### II.2.d. Analyse d'image

Une fois colorés, les gels sont scannés par un scanner calibré le GS-800 compatible avec le logiciel PDQuest (Bio-Rad/PDI Inc., MS Windows) utilisé pour l'analyse d'image. Les gels étant colorés à l'argent, nous sélectionnons un filtre vert, en lumière transmise. La résolution

choisie est de 63,5 x 63,5 microns. On réalise ensuite, pour chaque gel, une détection de l'ensemble des spots présents. Lors de cette étape, les gels originaux sont filtrés et lissés et des spots gaussiens en trois dimensions sont créés. On obtient donc trois images séparées : l'image d'origine, qui reste inchangée, une image filtrée et une image gaussienne, qui est une image synthétique (une représentation virtuelle du gel).

Les gels sont comparés entre eux, au sein d'un matchset, par rapport à une référence (image standard). Le standard est construit à partir d'un des gels du matchset, c'est une gaussienne de ce gel sur laquelle sont ajoutés les spots présents sur les autres gels. Pour la comparaison, les spots les mieux résolus et présents sur l'ensemble des gels serviront de point d'ancrage pour aligner et positionner les gels. On fait ensuite correspondre chaque spot de l'image standard avec les spots présents sur les gels du matchset.

L'intensité des spots est ensuite normalisée, nous avons choisi de normaliser l'intensité des spots par rapport à l'intensité totale des spots valides, cette intensité est ensuite exprimée en partie par million (ppm).

Les listes de spots et leurs intensités sont ensuite exportées sous format Excel.

#### II.2.e. Statistiques

Pour déterminer les différences d'expression protéique entre géotypes nous avons analysé l'intensité de chaque spot à l'aide des logiciels SASx8.1 et XLstat, un test One Way-ANOVA a été effectué sur la moyenne des intensités des 3 répliques par muscle par animal. La différence d'expression entre géotypes a été jugée significative si  $p < 0,05$ .

Pour déterminer l'existence d'expression protéique spécifique d'un muscle, les 4 muscles des individus RR ont été comparés entre eux. Nous avons utilisé la procédure GLM et un test de Tukey-Kramer à l'aide du logiciel Statistical Analysis System (SAS). Les spots ont été considérés comme différents pour  $p < 0,05$ . Nous avons étendu cette analyse aux muscles des individus TT en réalisant une Anova à 5% pour comparer les données entre les différents muscles.

#### II.2.f. Spectrométrie de masse et Identification protéique

A la suite des analyses statistiques certains spots protéiques se sont révélés intéressants dans le cadre de la comparaison entre géotypes ou dans celui de la comparaison entre muscles. Pour identifier les protéines qui les composaient nous avons utilisé la spectrométrie de masse par empreinte peptidique.

Les paramètres d'interrogation des bases de données que nous avons utilisés sont les suivants: 1 site de clivage trypsique omis, possibilité d'oxydation des méthionines et de carbamidométhylation des cystéines et nous avons autorisé une variation de la masse

inférieure à 30 ppm. De plus nous n'avons retenu que les protéines identifiées avec au moins 5 peptides et dont le score de probabilité correspondait aux critères du logiciel utilisé (Annexe I).

### II.2.g. Technique de SELDI-TOF

L'utilisation du sous fractionnement de l'échantillon permet d'abaisser le seuil de détection des protéines minoritaires en électrophorèse 2D. Ce sous fractionnement s'accompagne aussi d'une multiplication du nombre d'échantillons à analyser dans le but d'étudier chacune des fractions. La lourdeur de l'électrophorèse 2D ne permet pas de multiplier le nombre de gels à analyser dans un délai relativement court. Pour cela, nous avons décidé de tester une technique de spectrométrie de masse basée sur le sous fractionnement de l'échantillon directement sur la cible du spectromètre.

Dans le cadre de mon étude, nous avons choisi de faire le test sur des échantillons de *semimembranosus*, 8 animaux mâles TT et 8 mâles RR (Annexe I). Les échantillons de muscles ont été extraits comme pour l'électrophorèse bidimensionnelle (Tampon contenant 50 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris, 2 mM EDTA, 1% (w/v), DTT et 5 mM Pefabloc), puis ont été stockés à -80°C avant leur utilisation. Pour l'analyse proprement dite nous avons suivi le protocole fourni par la société CypherGen® et nous avons réalisé la lecture des échantillons sur le spectromètre de masse PCS4000 (CypherGen®). Nous avons testé les trois surfaces suivantes : H50, CM10, Q10.

### II.3. Expression génique

Le transcriptome est l'ensemble des ARN messagers (ARNm) exprimés dans une cellule, un tissu, à un temps donné.

Les techniques de quantification dites de "PCR en temps-réel" basées sur la fluorescence se sont développées et permettent une analyse très fine des différences d'expression. C'est la méthode que nous avons choisie pour visualiser les variations d'expression des ARNm de 5 gènes exprimés dans le muscle d'animaux âgés de trois mois et dans le muscle fœtal. Cette technique est bien adaptée pour travailler sur un nombre de gènes restreint.

#### II.3.a. Extraction des ARN totaux

De nombreux kits sont disponibles sur le marché pour faciliter cette étape. Nous avons utilisé le kit RNeasy Midi Prep de QIAGEN et avons suivi le protocole du fabricant en y incluant une étape de digestion à la DNase (élimination de l'ADN génomique). Les éluats d'ARN obtenus à partir de 150 à 200 mg de tissu musculaire (SM, VM et fœtal 70 jours) ont été stockés à -80°C. La qualité et la pureté de l'extraction ont été contrôlées sur gel d'agarose 1% par visualisation des bandes des ARN 16S et 28S, ainsi que par la mesure de l'absorbance à

260 nm (ARN) et 280 nm (ADN). La quantité d'ARN extraite variait de 0,1 g/L à 0,3 g/L en fonction des échantillons. (Annexe II).

### II.3.b. Transcription inverse

L'étape suivante de l'étude de l'expression des ARN est la transcription inverse. Comme pour l'extraction des kits sont disponibles dans le commerce. Nous avons donc utilisé le kit "High capacity cDNA archive kit" (Applied Biosystems). La transcription réalisée à l'aide de ce kit se faisant par amorces de types hexamères aléatoires nous avons rétro-transcrit les ARN totaux et pas uniquement les messagers porteurs d'une queue polyA. Les quantités d'ARN rétrotranscrits étant dépendantes de la quantité d'ARN extrait, les ADNc sont ensuite dilués pour obtenir une concentration identique pour tous les échantillons. Tous les ADNc ont été stockés à -20°C avant leur utilisation en PCR-temps réel.

### II.3.c. Amplification PCR-temps réel

Nous avons opté pour l'intercalant fluorescent (SYBR-green ®) car cette méthode ne nécessite pas la création de sondes fluorescentes (TaqMan), très spécifiques mais onéreuses. L'intercalant a l'avantage de s'appliquer à tous les gènes, du moment que les amorces d'amplification leur sont spécifiques.

A partir de la séquence génomique du gène et à l'aide du logiciel DNASTRIDER (PerkinElmer) on sélectionne une amorce sens et une amorce anti-sens, chacune d'une vingtaine de bases, et permettant d'amplifier des fragments ADN allant de 70 à 140 bp (paires de base) avec une température de fusion proche de 60°C. Lors de cette sélection les amorces ne doivent pas être trop riches en bases répétées et en paire Guanine-Cytosine. On s'assure de leur spécificité par une PCR classique et un dépôt sur gel d'agarose 1%.

L'amplification est réalisée avec une quantité d'ADNc total constante, c'est-à-dire que les ADNc obtenus à partir de 5 µg d'ARN ont été dilués au dixième ( $10^{-1}$ ) ceux obtenus à partir de 2 µg ont été dilués au quart ( $2,5 \cdot 10^{-1}$ ) et celui obtenu à partir de 1 µg a été dilué au demi ( $5 \cdot 10^{-1}$ ).

Le mélange réactionnel pour 1 point de PCR est constitué de: ADNc 5 µg; amorces sens 0,3 pmol; amorces anti-sens 0,3 pmol; Mix SYBRgreen 0,5X (kit "SYBR® Green Core Reagents" de Applied Biosystems), et d'eau pour un volume réactionnel final de 17,5 µL. L'amplification PCR se déroule comme suit: 95°C pendant 10min puis 40 cycles de 95°C pendant 15 s et 60°C pendant 1min. La mesure de fluorescence est effectuée à la fin de chaque cycle. Et chaque point PCR est réalisé en triplicat.

### *Gènes rapporteurs et méthodes de comparaisons*

La quantité d'ARNm total peut être variable d'un individu à l'autre, on utilise donc des gènes rapporteurs. Le calcul de l'expression d'un gène se fait donc de la façon suivante, pour chaque gène de chacun des (i) individus le  $\Delta Ct_i$  est calculé:

$$\Delta Ct_i = Ct_i - Ct_{\text{rapporteur}}$$

ensuite le  $\Delta Ct_i$  d'un individu est comparé à celui du Pool témoin (ici les pools RR):

$$\Delta\Delta Ct_i = \Delta Ct_{\text{Témoin}} - \Delta Ct_i$$

les expressions sont ensuite données par (R); où  $R = 2^{\Delta\Delta Ct}$ . Ainsi pour le témoin  $\Delta\Delta Ct_{\text{Témoin}} = 0$  donc  $R_{\text{Témoin}} = 2^0 = 1$ .

Nous avons sélectionné deux gènes rapporteurs ceux de la glyceraldéhyde 3-Phosphate déshydrogénase (GAPDH) et de la cyclophiline A, deux gènes utilisés précédemment pour une étude de criblage d'expression des gènes de la région du QTL Texel par l'équipe de H.Levéziel à Limoges. Cette étude réalisée sur des pools TT et RR d'échantillons de *semimembranosus* avait montré leur stabilité d'expression d'un individu à l'autre (D. Milenkovic, communication personnelle).

### II.3.d. Statistiques

Nous avons utilisé le logiciel XLSTAT version 7.5.3 pour analyser les différences entre les groupes RR, TT, RT. Un test non paramétrique de Kruskal-Wallis pour k échantillons indépendants a été appliqué pour déterminer s'il existait une différence dans les moyennes des 3 groupes pour chacun des muscles étudiés (VM, SM). Lorsqu'une différence était mise en évidence nous avons appliqué un test t de Student. Les données testées correspondant à (R), l'expression normalisée par le logiciel SDS 2.2.2 d'analyse PCR-temps réel.

Pour comparer l'expression des gènes entre les différents muscles (VM, SM et fœtus) deux à deux nous avons appliqué un test t de student au seuil  $p < 0,05$ .

**Partie II. Résultats**  
**&**  
**Discussions.**

# CHAPITRE I. DIFFERENCES INTERMUSCULAIRES DE L'EXPRESSION DES PROTEINES.

## I. EXPRESSION DES PROTEINES SARCOPLASMIQUES DE QUATRE MUSCLES OVINS.

L'objectif de ce travail était de caractériser les profils d'expression protéique de quatre muscles squelettiques d'agneaux. Dans ce but nous avons réalisé une analyse différentielle du protéome sarcoplasmique du *vastus medialis*, du *semimembranosus*, du *longissimus dorsi* et du *tensor fasciae latae*. Cette étude a été effectuée sur les animaux homozygotes RR pour pouvoir s'affranchir de l'effet de la mutation Texel sur les muscles. Tous ces muscles ont une composition en types de fibre hétérogène et relativement riche en fibres de type rapide.

### INTRODUCTION

Les qualités technologiques et sensorielles des viandes sont influencées en grande partie par les caractéristiques biochimiques du muscle [84]. Ces caractéristiques biochimiques sont dépendantes de la diversité fonctionnelle des muscles caractérisée par leur type de fibre. La composition en type de fibre de la plupart des muscles squelettiques est hétérogène, les proportions varient grandement d'un muscle à l'autre en fonction de la localisation du muscle et de sa fonction [85]. Tout cela induit une grande variabilité au niveau des propriétés sensorielles des viandes issues des différents muscles d'un animal. De plus, au sein même d'une espèce la composition en type de fibre peut varier en fonction de la race [50], du degré de maturité de l'animal [86] ou de son entraînement physique [87].

Selon leurs propriétés fonctionnelles les fibres squelettiques sont classées en deux grands types: les fibres à contraction lente et celles à contraction rapide. Elles sont habituellement distinguées par les activités des myosine-ATPases et par les isoformes des chaînes lourdes de myosine (MHC) [88, 89]. Les fibres lentes expriment majoritairement les isoformes MHC I, les fibres rapides peuvent exprimer 3 isoformes différentes (IIa, IIb, IIx) dans des proportions variables. Les différents types de fibre sont associés à différentes voies métaboliques pour produire l'énergie nécessaire à la contraction. Les fibres lentes sont associées à un métabolisme oxydatif prépondérant, les fibres rapides riches en MHC IIb ou IIx sont associées à un métabolisme principalement glycolytique quant aux fibres contenant des isoformes IIa elles sont associées aux deux voies métaboliques oxydative et glycolytique. Les approches traditionnelles, biochimiques ou histochimiques, d'étude des propriétés des types de fibres musculaires étaient basées sur un petit nombre de protéines, et ne prenaient donc pas en compte toute la complexité et la variété des mécanismes biochimiques mis en jeu. Les développements récents des outils d'analyse du protéome, telle l'électrophorèse bidimensionnelle suivie d'une identification des protéines par spectrométrie de masse,

permettent de caractériser plus finement les profils d'expression protéique des différents types de muscles. Jusqu'à présent la plupart des études ont été réalisées sur l'ensemble du protéome cellulaire, comprenant protéines sarcoplasmiques et protéines myofibrillaires. Ainsi la majorité des protéines identifiées étaient des enzymes impliquées dans la synthèse de l'ATP ou des protéines de l'appareil contractile qui sont les protéines les plus abondantes [90, 91]. Comme elles sont plus faiblement représentées les autres classes de protéines tels les facteurs de transcription et les facteurs impliqués dans la transduction du signal ne sont pas détectées. Les protéines sarcoplasmiques ne représentent que 30% des protéines totales musculaires, les méthodes de fractionnement cellulaire permettent d'accéder à ces fractions les moins représentées du protéome [80].

## RESUME

Les proportions des différents types de fibres varient grandement au sein d'un muscle et d'un muscle à l'autre en fonction de leurs différents rôles. Cela crée une forte variabilité des qualités technologiques et sensorielles de la viande. Pour approfondir les bases moléculaires de la variabilité des types de fibre. Nous avons utilisé une approche de protéomique (l'électrophorèse bidimensionnelle couplée à l'identification protéique en spectrométrie de masse) pour analyser la fraction sarcoplasmique de muscles squelettiques ovins et ainsi détecter et étudier les protéines présentes à de faibles concentrations (par rapport aux protéines myofibrillaires). Nous avons réalisé une analyse différentielle du protéome sarcoplasmique des muscles *vastus medialis*, *semimembranosus*, *longissimus dorsi* et *tensor fasciae latae*. Nous avons pu mettre en évidence plusieurs enzymes des voies métaboliques de production d'énergie, glycolytique et oxydative, ainsi que des protéines associées à la régulation du stress oxydant, des protéines de transport (carbonate déshydratase, myoglobine, fatty acid binding protein), des chaperonnes (HSP-27, HSP-60,  $\alpha$ -crystalline, DJ-1, stress induced phosphoprotein 1), des protéines de détoxification et de dégradation des protéines endommagées également impliquées dans certaines voies de signalisation (GST-Pi, aldéhyde déshydrogénase, peroxyredoxine, ubiquitine), des protéines impliquées dans la synthèse protéique, l'alpha-1-antitrypsine qui pourrait influencer l'apport de fer aux cellules et enfin la 20  $\alpha$ -hydroxystéroïde déshydrogénase qui inactive la progestérone

# Differential expression of sarcoplasmic proteins in four heterogeneous ovine skeletal muscles

M. Hamelin\*, T. Sayd\*, C. Chambon†, J. Bouix‡, B. Bibé‡, D. Milenkovic§, H. Leveziel§, M. Georges||, A. Clop||, P. Marinova# and E. Laville\*<sup>1</sup>

\*Unité Qualité des Produits Animaux, INRA, 63122 St-Genès-Champanelle, France

†Plateforme protéomique, INRA, 63122 St-Genès-Champanelle, France

‡Station d'Amélioration Génétique des Animaux, INRA, 31326 Castanet-Tolosan, France

§Unité de Génétique Moléculaire Animale, INRA-Université de Limoges, 87060 Limoges, France

||Département de Génétique, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, 4000 Liège, Belgium

#Institute of Animal Science, 2232 Kostinbrod, Bulgaria

<sup>1</sup>Corresponding author: e-mail [elaville@clermont.inra.fr](mailto:elaville@clermont.inra.fr)

Unité Qualité des produits Animaux, INRA, 63122 St-Genès-Champanelle, France

Fax: +33 (0)4 73 62 42 68

Abbreviations: A1AT, alpha-1-antitrypsin; 20- $\alpha$ HSD, 20-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase; LD, *longissimus dorsi*; SM, *semimembranosus*; Tf, Transferrin; TL, *tensor fasciae latae*; VM, *vastus medialis*.

Keywords: muscle-fiber types; oxidative stress regulators; sarcoplasmic proteins; sheep; two-dimensional gel electrophoresis

## Abstract

Fiber-type distribution is known to vary widely within and between muscles according to differences in muscle functions. 2-DE and MALDI-MS were used to investigate the molecular basis of muscle fiber type-related variability. We compared four lamb skeletal muscles with heterogeneous fiber-type composition that are relatively rich in fast-twitch fiber types, i.e. the *semimembranosus*, *vastus medialis*, *longissimus dorsi* and *tensor fasciae latae* (TL). Our results clearly showed that none of the glycolytic metabolism enzymes detected, including TL which was most strongly glycolytic, made inter-muscular differentiation possible. Muscles differentiation was based on the differential expression of proteins involved in oxidative metabolism, including not only citric acid cycle enzymes but also other classes of proteins with functions related to oxidative metabolism, oxidative stress and probably to higher protein turnover. Detected proteins were involved in transport (carbonate dehydratase, myoglobin, fatty acid-binding protein), repair of misfolding damage (heat shock protein 60kDa, heat shock protein 27 kDa, alpha-crystallin beta subunit, DJ1, stress-induced phosphoprotein), detoxification or degradation of impaired proteins (glutathione S-transferase Pi, aldehyde dehydrogenase, peroxiredoxin, ubiquitin) and protein synthesis (tRNA-synthetase). The fractionating method led to detection of proteins involved in different functions related to oxidative metabolism that have not previously been shown concomitancy.

## 1 Introduction

The technological and sensorial qualities of meat are to a great extent influenced by the biochemical characteristics of muscle [1]. The degree to which these characteristics vary is governed by the functional diversity of the muscles, which is expressed by their fiber types. The fiber-type composition of most skeletal muscles is heterogeneous: fiber type distribution is known to vary widely both between and within muscles depending on muscle location and function [2]. This leads to significant variability in the sensorial properties of meat derived from different animal muscles. In addition, fiber-type composition may vary within a species according to breed [3], physiological maturity [4] or physical activity [5].

Skeletal fibers are classified as either slow-twitch or fast-twitch fibers depending on their function properties. They are commonly distinguished by myosin ATPase activity and polymorphism of the myosin heavy chain (MHC) [6, 7]. Slow-twitch fibers express type I MHC isoform whereas fast-twitch fibers may express three different isoforms, i.e. types IIa, IIb or IIx. Fiber types with different contractile equipment present different metabolic pathways for producing contractile energy. Slow-twitch fibers have a predominantly oxidative metabolism, while fast-twitch fibers rich in IIb or IIx MHC isoforms

have a predominantly glycolytic metabolism and fibers rich in the IIa MHC isoform share both oxidative and glycolytic metabolism.

Until recently, traditional biochemical or histochemical approaches to studying the properties of muscle fiber types were based on only a few proteins and therefore did not take into account the full complexity and multiplicity of biochemical mechanisms. Recently developed proteomics tools (2-DE followed by protein identification using mass spectrometry) appear capable of providing a more detailed characterization of the protein expression profiles of different muscle types. The majority of studies to date were performed on the whole proteome, including sarcoplasmic and myofibrillar fractions. Most of the proteins characterized were found to be metabolic enzymes involved in ATP synthesis and contractile proteins which are the most abundant protein in the muscles [8, 9]. Other classes of proteins such as transcription factor and signal transduction factors are present at low levels and are therefore not detected. Fractionating methods, such as those developed for the specific study of sarcoplasmic proteome containing only 30% of total proteins of muscle cells, appear suitable for the detection of less-expressed proteins [10, 11].

The overall objective of the present study was to characterize the protein expression of four different ovine skeletal muscles. For this purpose, differential proteome analysis was performed on sarcoplasmic fraction. The muscles chosen all present heterogeneous fiber-type composition and are relatively rich in fast-twitch fiber types.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Animals and muscle samples

We used crossbred lambs originating from an F2 crossing between Romanov ewes and Belgian Texel rams. Seventeen lambs (n = 8 males, 9 females) were slaughtered at a weight set at 33 kg for females and 39 kg for males to match commercial carcass weight. After slaughter, the carcasses were dressed according to commercial practices. The four muscles studied were the *longissimus dorsi* (LD), which is the main back muscle, and the *vastus medialis* (VM), *semimembranosus* (SM) and *tensor fasciae latae* (TL) which are found in the proximal segment of the hind legs. These heterogeneous muscles were chosen according to contractile and metabolic type. LD and SM muscles were chosen as fast-twitch red muscle while the TL is fast-twitch white and the VM presents the highest proportion of slow-twitch red fibers of all four muscles. The samples were typed by histochemical analysis to confirm these patterns. Muscle samples were taken within 30 min after following slaughter from the centre of the muscle slices. Slices were cut transversally to fiber direction in the midbelly muscle region of the VM, SM and TL muscles. The LD muscle slice was sampled between the last thoracic vertebra and the first lumbar vertebra. Samples intended for histochemical typing (N = 17) were cooled with isopentane frozen in

liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until experimental use. Five randomly-chosen electrophoresis samples (3 males, 2 females) were frozen in liquid nitrogen and then reduced to a fine powder under liquid nitrogen using a mortar and a mechanical pestle, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until protein extraction.

## 2.2 Histochemistry

Transverse muscle cryo-sections ( $10\ \mu\text{m}$ ) were prepared as described by Sayd *et al.* [3]. One section was stained using the myosin ATPase method following pre-incubation at pH 4.45 in order to define the three fiber types I, IIA and IIB. The next section was stained for succinate dehydrogenase to divide the IIB type into either a more oxidative (IIBox) or less oxidative (IIBno) subgroup. Typing was realized on an average of 300 fibers per muscle.

## 2.3 Sarcoplasmic protein extraction

The 2-DE gels were run on 5 SM, LD and TL muscles and 4 VM muscles. Gels were produced in triplicate. The sarcoplasmic fraction was obtained using a method adapted from the subcellular fractionation technique described by Pietrzak [12]. The extraction buffer consisted of 50 mM KCl, 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM Tris, 2 mM EDTA, 1% (w/v) DTT and 5 mM Pefabloc at pH7. Muscle samples (150 mg) were added to 1.5mL of extraction buffer in a micro-centrifuge tube containing a glass bead. Homogenization was performed in a ball mill (Retsch MM2 agitator, Retsch, Haan, Germany) for 1 h at  $4^{\circ}\text{C}$ . Extracts were centrifuged at 10,000 g for 15 min at  $6^{\circ}\text{C}$  and the supernatant was collected. Samples were frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 2.4 Two-dimensional electrophoresis

Immobilized pH gradient (IPG) isoelectric focusing (IEF) was carried out in a Protean IEF cell (Bio-Rad; Hercules, CA), using a 17-cm, pH5–8 Bio-Rad ReadyStrip. The strips were protein-loaded for analytical (110  $\mu\text{g}$ ) or preparative electrophoresis gels (300  $\mu\text{g}$ ) by adding an appropriate volume of extract to a buffer consisting of 7M urea, 2M thiourea, 2% (w/v) CHAPS, 5 mM Pefabloc, 0.2% (w/v) DTT and 0.2% carrier ampholytes. The strips were rehydrated overnight. For the subsequent IEF, voltage was increased gradually to 8000 V to reach a total of 80,000 Vh. The strips were then immediately frozen and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until further use. Prior to SDS–PAGE, strips were equilibrated for 15 min followed by 20 min in a solution of 6M urea, 30% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS and 50 mM Tris HCl successively supplemented with 1% (w/v) DTT or 2.5% (w/v) iodoacetamide and bromophenol blue as a dye. SDS–PAGE was performed in a protean Iixi cell (Bio-Rad) on 12% polyacrylamide gels at 15 mA per gel until the dye track reached the end of the gels. Analytical and preparative gels were silver-stained following the protocol described by Yan *et al.* [13].

## 2.5 Image analysis

Gel images were acquired through a GS-800 densitometer and analyzed using PDQuest software (Bio-Rad). After automated detection and matching, highly saturated or ill-defined spots were manually removed, and cross-gel matching was checked and corrected when necessary. Spots were normalized by expressing relative quantity of each spot as the ratio of individual spot quantity to the total quantity of valid spots, expressed in ppm. For one sample and one spot, the mean of the three values (for gels run in triplicate) was calculated.

## 2.6 Statistics

Statistical analysis was performed using SAS software (SAS Inst., INC; Cary, NC). The ANOVA procedure was used to test for significance ( $P < 0.05$ ) of the statistical fixed effect of muscle on fiber type percentage. Where significant effects were found, Tukey comparison tests were used to identify differences between pairs of muscles at the 5% significance level. Concerning 2D electrophoresis, because data were unbalanced ( $N = 4$  in VM;  $N = 5$  in LD, SM and TL muscles), the GLM procedure was used to test for significance ( $P < 0.05$ ) of the statistical fixed effect of muscle on the averaged spot quantities. Where significant effects were found, Tukey-Kramer comparison tests for unbalanced data were used to identify differences between pairs of muscles at the 5% significance level.

## 2.7 Identification of spots of interest by MALDI-ToF mass spectrometry

Spots were excised from gels using pipette tips. Gel pieces were placed in a 1.5 mL Eppendorf tube and destained for 2 min with a solution containing 30 mM KFe and 100 mM Sodium thiosulfate, and the gel pieces were washed three times for 10 min in purified water (eg., 18.2 ohms). The spots were then washed with 100  $\mu$ L of 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ /5% acetonitrile for 30 min, followed by 100  $\mu$ L of 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ /acetonitrile (v/v) twice for 30 min, and dehydrated in acetonitrile. Gel spots were completely dried using a speed vac before trypsin digestion. The dried gel volume was evaluated, and three volumes of trypsin (V5111; Promega, Madison, WI, USA) 10 ng/ $\mu$ l in 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  were added. Digestion was performed at 37°C during 5 hours. The gel pieces were centrifuged and 8 to 12  $\mu$ l of acetonitrile (depending on gel volume) were added to extract the peptides. This mixture was sonicated for 5 min and centrifuged. For MALDI-TOF MS analysis, 1  $\mu$ l of supernatant was loaded directly onto the MALDI target. The matrix solution (5mg.mL<sup>-1</sup>  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile/0.1% trifluoroacetic acid) was immediately added and allowed to dry at room temperature. A Voyager DE-Pro model MALDI-TOF mass spectrometer (PerSeptive BioSystems, Farmingham, MA) was used in positive-ion reflector mode for peptide mass fingerprinting. External calibration was performed with a standard peptide solution (Proteomix, LaserBio Labs, Sophia-Antipolis, France). Internal calibration was

performed using peptides resulting from auto-digestion of porcine trypsin with protonated masses of 842.509, 1045.564 and 2211.104. Peptide mass fingerprints were compared to mammalian databases (NCBI and SWISS-PROT) using MASCOT and ProFound software (accessed at <http://www.matrixscience.com> and <http://prowl.rockefeller.edu>, respectively). The search criteria used were one missing trypsin cleavage site, partial methionine oxidation, partial carbamidomethylation of cysteine and a mass deviation lower than 30 ppm. We required at least 5 matched peptides per protein for identification and used ProFound and MASCOT probabilistic scores, accuracy of the experimental-to-theoretical *pI* and molecular weight (*Mw*).

### 3 Results and discussion

#### 3.1 Histochemistry

Results of the histochemical analysis are presented in table 1. In comparison with VM, the TL, SM and LD muscles were predominantly fast-twitch (IIB). Among this group, the TL presented the highest rate of white fast-twitch fibers (IIB). The LD muscle was characterized by a higher rate of fast-twitch red IIA fibers while the SM showed a higher rate of slow-twitch red fibers (I). The VM had higher rate of slow-twitch red fibers and a predominantly oxidative metabolism (I, IIBox).

#### 3.2 Differences in protein profiles according to muscle

Up to 500 spots were detected per gel (Fig. 1). After removal of saturated zones and poorly reproducible zones, about 300 spots were successfully matched across the whole set of images. The number of gel-detected proteins from sarcoplasmic fractions was comparable to the number of proteins evidenced on the whole muscle proteome [14], thus indicating that the fractionating method allowed us to evidence less-expressed proteins.

Seventy seven spots were differentially expressed between muscles. We managed to identify 47 proteins (Tables 2 and 3, Fig.1 and 2). This relatively high fail-rate in identification was in part due to the fact that the ovine genome is not fully sequenced. Furthermore, although the highly sensitive silver staining method we used allowed precision detection of protein expression, there was often an insufficient quantity of protein to enable identification by MALDI-MS, even when pooling excised spots from different gels. Based on apparent *Mw* lower than theoretical *Mw*, some of the spots identified were protein fragments. All these fragments derived from glycolytic enzymes (pyruvate kinase, lactate dehydrogenase, creatine kinase and glycogen phosphorylase). Five of these fragments were overexpressed in SM muscle and one was overexpressed in TF muscle. Previous studies using 2-DE also reported protein fragments in muscles sampled very early after slaughter [15, 14, 10]. It was supposed that the presence of fragments which are often glycolytic enzymes was due to early proteolysis after slaughter, probably *intra vitam* proteolysis. Based on the observed equivalent *Mw* to theoretical *Mw*, the

other 41 proteins were full-length proteins. These full-length proteins are grouped according to function and described below.

### **3.2.1. Glycolytic metabolism**

Sixteen spots were identified as glycolytic enzymes, six of which were fragments. Some full-length proteins, i.e. pyruvate kinase, creatine kinase, enolase and triosephosphate isomerase were redundant, and probably corresponded to isoforms of the protein. In the case of pyruvate kinase, three spots (isoforms) were specifically overexpressed in VM, TL and SM muscles. Two isoforms of triosephosphate isomerase were upregulated in LD muscle. This protein is involved in shunting the main glycolysis pathway. Thus, the increased triosephosphate isomerase expression in LD muscle can be interpreted by under-activation of the main glycolysis pathway. The LD muscle was also characterized by a lower expression of two isoforms of creatine kinase which is an enzyme essential to a rapid replenishment of cellular ATP stocks. Okumura [9] found creatine kinase was more strongly expressed in more glycolytic muscles. One enolase isoform was also downregulated in LD muscle, while the two other isoforms of enolase and fructose-1,6-biphosphatase were upregulated in SM muscle. In comparison with other muscles, SM seems to present an accelerated glycolytic metabolism and, in contrary to the LD, also seems to be less glycolytic. Interestingly, VM muscle, which has the highest rate of slow oxidative fiber types, did not express specific downregulation of glycolytic enzymes. The TL muscle, which has the highest rate of IIB fiber type, did not show specific upregulation of glycolytic enzymes.

### **3.2.2. Oxidative metabolism**

Six spots related to oxidative metabolism were identified as enzymes involved in the citric acid cycle (NADH dehydrogenase 24kDa subunit, succinate-CoA ligase, ubiquinol-cytochrome c reductase, dihydrolipoamide S-succinyltransferase and malate dehydrogenase). Malate dehydrogenase was expressed under two isoforms which were not specific to muscle type. Most of these proteins were upregulated in VM muscle, which had the highest rate of slow-twitch oxidative fibers, and downregulated in TF muscle, which had the highest rate of fast-twitch glycolytic fibers. The two other muscles presented intermediate profiles.

### **3.2.3. Contractile-associated proteins**

Parvalbumin expression may be related to muscle contraction. This calcium-binding protein is highly expressed in mammalian fast-twitch muscle fibers. By acting as a  $\text{Ca}^{2+}$  buffer, its overexpression does not affect the rapid contraction phase but leads to a significantly increase in the rate of relaxation [16]. It was overexpressed in TL, which is the most abundant in fast-twitch fibers.

Actin alpha 1 which is the monomeric form of actin filaments was more expressed in VM, the most oxidative muscle. This overexpression may be related to a differential extractability of this structural protein in VM muscle or may indicate an increased need of material to promote myofibril assembly, related to a higher protein turnover.

### **3.2.4. Oxidative metabolism-related proteins**

Proteins were identified presenting different oxidative metabolism-associated. The three transport proteins carbonate dehydratase II, also known as carbonic anhydrase, which catalyzes the reversible hydration of carbon dioxide and facilitates its transport, the intracellular oxygen-binding protein myoglobin and the heart-type cytoplasmic fatty acid-binding protein were all overexpressed in VM muscle and underexpressed in TL muscle. Other muscles showed intermediate patterns. The fatty acid-binding protein plays a role in the uptake of fatty acids by skeletal muscles. It is most abundant in oxidative muscles [17] where fatty acids contribute significantly to oxidative metabolism.

Besides these transport proteins, the majority of the oxidative metabolism-related proteins detected may play a role in the regulation of stress. Some presented a detoxification function. The glutathione S-transferase class Pi catalyzes the conjugation of glutathione to potentially toxic compounds such as nitric oxide species (NOS) and reactive oxygen species (ROS) [18]. Aldehyde dehydrogenase and antiquitin (of the aldehyde dehydrogenase family) are required for the clearance of potentially toxic aldehydes derived from lipid oxidation. Peroxiredoxin has antioxidant activity and also presents signal transduction functions. There is little information on the substrate protein of mitochondrial ATP-dependent proteinase SP-22 and haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 2. ATP-dependent proteinase SP-22 was detected in two isoforms and classified as an antioxidant protein. haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 2 was classified as a stress-regulating and defense protein [19]. Proteins involved in cell detoxification were upregulated in the most oxidative muscle (VM). Oxidative metabolism is known to produce ROS. These generally very small molecules are highly reactive due to the presence of unpaired valence shell electrons. Natural ROS byproducts of the normal metabolism of oxygen can damage proteins in cells which are normally able to neutralize them. Interestingly, more glycolytic muscles such as the TL and SM showed high levels of certain detoxifying proteins (peroxiredoxin, antiquitin), thus indicating that they were also subjected to toxic compounds.

The following proteins are chaperones whose function is to repair protein misfolding damage and stabilize protein assembly. The heat shock protein 60kDa stabilizes proteins and facilitates protein folding and assembly in the mitochondrial matrix. Its expression is increased in skeletal muscle after prolonged endurance training leading to increased metabolic demand associated with oxidative fiber type muscle [20]. The DJ1 enables protein refolding and may also be involved in degradation pathways [21]. The heat shock protein-27 (HSP-27) has been reported to play a central role in the structural and

functional organization of the three-dimensional intermediate filament and the actin microfilament system [22]. Neuffer and Benjamin [23] reported that the pool of immunologically detected HSP-27 was larger in oxidative fibers and increased in response to an increased oxidative metabolism. The  $\alpha$ -crystallin beta subunit is most abundant in tissues with high oxidative capacity, including the heart and type I skeletal muscle fibers [23]. We also detected two isoforms of stress-induced phosphoprotein 1, which mediates the association of the molecular chaperones HSC70 and HSP90. In the detoxification protein group, chaperone proteins were upregulated in the most oxidative muscle (VM), thus confirming that oxidative metabolism is a source of protein denaturation. Except for HSP-27 and  $\alpha$ -crystallin, the chaperone proteins displayed relatively high expression in the most glycolytic TL muscle, suggesting that some chaperone proteins are also required in glycolytic muscles.

When they are not repaired, misfolded proteins are degraded by the ubiquitin-proteasome system. Ubiquitin monomers are sequentially attached to target proteins. These ubiquitin-marked proteins are then digested by the proteasome. Ubiquitin was upregulated in the most oxidative VM muscle as well as the most glycolytic SM and TL muscles but downregulated in LD. Finally, we also identified seryl-aminoacyl-tRNA synthetase 1, which showed a similar pattern of expression to ubiquitin and which is involved in protein synthesis. Similarly to ubiquitin and the monomeric form of actin, it may be related to a higher protein turnover.

### 3.2.5. Miscellaneous

In addition, alpha-1-antitrypsin (A1AT) and 20-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (20- $\alpha$ HSD) were detected. A1AT is a member of the serine protease inhibitor protein family (serpins) whose main target is the elastase [24]. Graziadei [25] reported another function for A1AT, because it presents a great affinity to the Transferrin (Tf) membrane receptor, meaning it competes directly with Tf for the receptor site. A1AT was overexpressed in TL muscle.

20- $\alpha$ HSD catalyzes the reaction of progesterone to the inactive form 20  $\alpha$ -hydroxyprogesterone. The ovarian hormone estrogen is known to increase metabolic capacity, particularly fatty acid oxidation. Conversely, progesterone negates this effect. Inactivation of progesterone by 20- $\alpha$ HSD may therefore have consequences on metabolism [26]. The 20- $\alpha$ HSD presented differential expression in the four muscles studied. It was overexpressed in the more oxidative VM and downregulated in the most glycolytic TL, while SM and LD muscles showed intermediate profiles.

To summarize, protein expression was most clearly differentiated muscle in the VM, where seventeen proteins (of which 16 were overexpressed) distinguishing it from the three other muscles. The VM showed the highest abundance of enzymes involved in oxidative metabolism and oxidative stress-related proteins. Enzymes involved in the glycolytic pathway were not downregulated. The muscle showing the least differentiated protein expression was the SM, in which nine spots were differentially expressed.

The SM showed intermediate expression patterns for enzymes involved in both glycolytic and oxidative metabolisms. Its main feature was that it presented the highest levels of protein fragments. The TL muscle was characterized by the lowest expression of oxidative pathway enzymes. It should be underlined that except for HSP-27 and  $\alpha$ -crystallin, the proteins classified as 'oxidative metabolism-related proteins' displayed relatively high expression, suggesting that most stress proteins were not specific to oxidative metabolism. The LD muscle expressed low abundance of glycolytic enzymes and an intermediate abundance of oxidative enzymes, and was characterized by a relatively low abundance of 'stress-related proteins'.

#### 4 Concluding remarks

This study compared the expression of sarcoplasmic proteins in four different muscles (VM, SM, LD and TL) which were all relatively rich in fast-contracting fiber types, as is the case in most muscles of farm animals. The TL was fast-glycolytic, the VM was slow-oxidative, and the SM and LD were intermediates. The main finding of the study was that glycolytic metabolism enzymes did not allow muscle differentiation, even in the most glycolytic muscle (TL). Inter-muscular differentiation was based on the differential expression of proteins involved in oxidative metabolism, not only enzymes of the citric acid cycle but also other classes of proteins whose functions can be related to oxidative metabolism. The fractionating method led to the detection of many proteins involved in stress regulation, signal transduction and transcription. These observations suggest that more oxidative muscle fibers are submitted to more stressful conditions and probably present a higher protein turnover. We have shown that proteins involved in cell detoxification, the repair of misfolding damage, the degradation of impaired proteins and protein synthesis were more strongly expressed in oxidative muscle.

## References

- [1] Monin, G., Ouali, A., in: *Development in Meat Science*, vol.5. London: Elsevier Applied Science, *Muscle differentiation and meat quality*. 1991, pp. 89-157.
- [2] Armstrong, R. B., Phelps, R. O., *A. J. Anat.* 1984, *171*, 259-272.
- [3] Sayd, T., Méra, T., Martin, V., Laville, E., *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 1998, *120*, 153-163.
- [4] Solomon, M. B., Moody, W. G., Kemp, D. J., Ely, D. J., *J. Anim. Sci* 1981, *52*, 1019-1025.
- [5] Fry, A. C., Allemeier, C. A., Staron, R. S., *Eur. J. Appl. Physiol.* 1994, *68*, 246-241.
- [6] Brooke, M. H., Kaiser, K. K., *J. Histochem. Cytochem.* 1970, *18*, 670-672.
- [7] Schiaffino, S., Reggiani, C. J., *Appl. Physiol.* 1994, *77*, 493-501.
- [8] Kim, N. K., Joh, J. H., Park, H. R., Kim, O. H., Park, B. Y., Lee C. S., *Proteomics* 2004, *4*, 3422-3428.
- [9] Okumura, N., Hashida-Okumura, A., Kita, K., Matsubae, M., *et al.*, *Proteomics* 2005, *5*, 2896-2905.
- [10] Sayd, T., Morzel, M., Chambon, C., Franck, M., *et al.*, *J. of Agri. food Chem.* 2006, *54*, 2732-2737.
- [11] Jia, X., Hollung, K., Therkildsen M., Hildrum, K. I., Bendixen, E., *Proteomics* 2006, *6*, 936-944.
- [12] Pietrzak, M., Greaser, M. L., Sosnicki, A. A., *J. Anim. Sci.* 1997, *75*, 2106-2116.
- [13] Yan, J. X., Wait, R., Berkelman, T., Harry, R. A., *et al.*, *Electrophoresis* 2000, *21*, 3666-3672.
- [14] Morzel, M.; Chambon, C.; Hamelin, M.; Santé-Lhoutellier, V. *et al.*, *Meat Sci.* 2004, *67*, 689-696.
- [15] Lametsch, R., Roepstorff, P., Bendixen E., *J. Agric. Food Chem.* 2002, *50*, 5508-5512.
- [16] Chen, G., Carroll, S., Racay, P., Dick, *et al.*, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2001, *281*, C114-C122.
- [17] Glatz, J. F. C., Shaap, F. G., Binas, B., Bonen, A., *et al.*, *Acta Physiol. Scand.* 2003, *178*, 367-371.
- [18] Lo Bello, M., Nuccetelli, M., Caccuri, A. M., Stella, L., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 2001, *276*, 42138-42145.
- [19] Lei, Z., Elmer, A. M., Watson, B. S., Dixon, R. A., *et al.*, *Molecular and cellular proteomics* 2005, *4*, 1812-1825.
- [20] Liu, Y., Steinacker, J. M., *Front Biosci.* 2001, *6*, D12-25.
- [21] Chen, L., Cagniard, B., Mathews, T., Jones, S., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 2005, *280*, 21418-21426.
- [22] Fischer, D., Matten, J., Reimann J., Bonnemann C., Schroder, R. *Acta Neuropathol. (Berl)* 2002, *104*, 297-304.
- [23] Neuffer, P. D., Benjamin, I. J., *J. Biol. Chem.* 1996, *271*, 24089-24095.
- [24] Gettins, P. G. *Chem. Rev.* 2002, *102*, 4751-804.
- [25] Graziadei, I., *Biochimica et Biophysica Acta* 1998, *1401*, 170-176.
- [26] Campbell, S. E., Febbraio, M. A., *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2001, *4*, 515-520.

Table 1. Effect of muscle type on fiber type percentage.

Fiber type % <sup>e</sup>	Muscle <sup>f</sup>			
	LD	SM	TL	VM
I	10±4 <sup>a</sup>	13.6±4.5 <sup>b</sup>	7.3±3.7 <sup>a</sup>	24.4±4.4 <sup>c</sup>
IIa	22.8±7.7 <sup>a</sup>	18.5±7.9 <sup>a</sup>	18.9±5.7 <sup>a</sup>	17.9±3.3 <sup>a</sup>
IIb	67.2±7.8 <sup>a</sup>	68.9±9 <sup>a</sup>	73.8±7.6 <sup>b</sup>	57.7±4.9 <sup>c</sup>
IIbox	27.9±9.6 <sup>a</sup>	24.8±10.5 <sup>a</sup>	28.9±10.2 <sup>a</sup>	34.5±6.5 <sup>a</sup>
IIbno	39.3±7.7 <sup>a</sup>	43.1±13.9 <sup>a</sup>	44.8±8.1 <sup>a</sup>	23.2±3 <sup>b</sup>

<sup>abcd</sup> On a same line, means with different superscripts differ ( $P < 0.05$ ), if two means have the same superscript they are not significantly different

<sup>e</sup> I, fiber type I; IIa, fiber type IIa; IIb, fiber type IIb; IIbox, fiber type IIb, more oxidative; IIbno, fiber type IIb, less oxidative. IIbox and IIbno are subdivisions of IIb

<sup>f</sup> LD, *longissimus dorsi*; SM, *semimembranosus*; TL, *tensor fasciae latae*; VM, *vastus medialis* (N= 17 per muscle)

## M

Table 2. Proteins differentially expressed between the four muscles.

SSP <sup>1</sup>	Protein ID <sup>2</sup>	Accession number <sup>2</sup>	Mw kDa/ pI obs <sup>3</sup>	Mw kDa/ pI theo <sup>3</sup>	% cover <sup>4</sup>	Matched peptide <sup>4</sup>	p < 0.05 <sup>5</sup>	Species <sup>4</sup>
7530R	Creatine Kinase M	gij4838363	46 / 7.25	43 / 6.63	53%	21	<0.0001	<i>B. taurus</i>
7202R	Creatine kinase M <b>fgt</b>	gij4838363	29 / 7.1	43 / 6.63	27%	10	<0.0001	<i>B. taurus</i>
7409R	Enolase 3 (a)	gij7331113	45 / 7.3	47 / 7.58	46%	24	<0.0001	<i>O. aries</i>
6407R	Enolase 3 (b)	gij56206033/gij57164373	45 / 6.8	69 / 5.80	31%	16	<0.0001	<i>M. musculus</i>
6607R	Enolase alpha	gij57086919/gij27806645	50 / 6.9	47 / 6.44	23%	9	<0.0001	<i>H. sapiens</i>
6307R	Fructose-1,6-bisphosphatase 2	gij2154755	39 / 7.0	37 / 6.84	13%	5	<0.0001	<i>H. sapiens</i>
6203R	Glycogen phosphorylase (a) <b>fgt</b>	gij2352268/gij57163939	35 / 6.9	97 / 6.65	16%	13	<0.0001	<i>O. aries</i>
6207R	Glycogen phosphorylase (b) <b>fgt</b>	gij2352268/gij57163939	35 / 7.0	97 / 6.65	12%	13	<0.0001	<i>O. aries</i>
6005R	Lactate Dehydrogenase A <b>fgt</b>	gij217590	13 / 6.9	37 / 8.44	24%	8	<0.0001	<i>O. aries</i>
7617R	Pyruvate Kinase	gij1177221	56 / 7.3	58 / 7.2-7.96	40%	22	<0.0001	<i>O. cuniculus</i>
8702R	Pyruvate kinase, isoform M1 (a)	gij89089	60 / 7.5	58 / 7.2-7.96	35%	19	<0.0001	<i>F. catus</i>
8609R	Pyruvate kinase, isoform M1(b)	gij2117873/gij33286422	55 / 7.8	58 / 7.2-7.96	39%	20	<0.0001	<i>H. sapiens</i>
5515R	Pyruvate kinase 3, isoform 2 <b>fgt</b>	gij33286422	47 / 6.5	58 / 7.2-7.96	27%	9	<0.0001	<i>H. sapiens</i>
5437R	Pyruvate kinase 3, isoform 1 <b>fgt</b>	gij31416989	43 / 6.5	58 / 7.2-7.96	23%	11	<0.0001	<i>H. sapiens</i>
6205R	Triosephosphate isomerase 1 (a)	gij59858493	30 / 6.87	27 / 6.45	70%	16	<0.0001	<i>B. taurus</i>
6206R	Triosephosphate isomerase 1 (b)	gij59858494	30 / 6.93	27 / 6.45	82%	18	<0.0001	<i>B. taurus</i>

<sup>1</sup> Spot label

<sup>2</sup> Protein names and Accession numbers were taken from the NCBI database

<sup>3</sup> Mw and pI, both theoretical (recorded in the NCBI database) and estimated (calculated from the spot position on the gel)

<sup>4</sup> Number of peptides that matched the protein sequence, total percentage of sequence coverage and the species for which sequence was matched

<sup>5</sup> p-value from GLM analysis, significant level is 5%

**Fgt:** protein fragment

Table 2. Proteins differentially expressed between the four muscles (continued)

SSP <sup>1</sup>	Protein ID <sup>2</sup>	Accession number <sup>2</sup>	Mw kDa/ pI obs <sup>3</sup>	Mw kDa/ pI theo <sup>3</sup>	% cover <sup>4</sup>	Matched peptide <sup>4</sup>	p < 0.05 <sup>5</sup>	Species <sup>4</sup>
3614R	Dlst protein, dihydrolipoamide S-succinyltransferase	gij23271834	53 / 6.15	22 / 6.43	40%	8	<0.0001	<i>M. musculus</i>
6302R	Malate dehydrogenase (a)	gij164543	40 / 6.7	36 / 6.91	31%	9	<0.0001	<i>B. taurus</i>
5308R	Malate dehydrogenase (b)	gij61856478	40.5 / 6.6	33 / 6.2	32%	9	<0.0001	<i>B. taurus</i>
3208R	NADH dehydrogenase 24 kDa subunit	gij1364245	29 / 6.1	23.5 / 5.7	27%	5	<0.0001	<i>B. taurus</i>
3501R	Succinate-CoA ligase	gij55957255/gij55957259	46.5 / 5.8	48 / 6.65	31%	12	<0.0001	<i>H. sapiens</i>
2611R	Ubiquinol-cytochrome c reductase	gij27807137	50 / 6.7	53 / 5.94	43%	15	<0.0001	<i>B. taurus</i>
1509R	Actin, skeletal muscle	gij71611	47 / 5.1	42 / 5.31	37%	13	<0.0001	<i>O. cuniculus</i>
1008R	Parvalbumin $\alpha$	gij131103	12 / 4.9	12 / 4.98	48%	8	<0.0001	<i>O. aries</i>
7206R	Carbonate dehydratase II	gij68289	32 / 7.4	29 / 6.41	50%	7	<0.0001	<i>O. aries</i>
2007	FABP-H (a)	Q8HY78/gij26000692	11.5 / 5.5	15 / 6.11	49%	7	<0.0001	<i>C. Familiaris</i>
3002R	FABP-H (b)	Q8HY78/gij26000691	11.5 / 6.0	15 / 6.11	35%	6	<0.0001	<i>O. aries</i>
7009R	Myoglobin	gij70563	15 / 7.3	17 / 6.94	51%	7	<0.0001	<i>O. aries</i>
3106R	DJ-1 protein	gij50513593/gij59858513	25 / 6.0	20 / 6.84	47%	6	<0.0001	<i>B. taurus</i>
5206R	HSP-27, heat shock protein 27kDa	gij50979116	29 / 6.7	23 / 6.0-6.2	44%	9	<0.0001	<i>B. taurus</i>
2702R	HSP-60, heat-shock protein 60kDa	gij1334284	60 / 5.4	61 / 5.71	27%	8	<0.0001	<i>R. norvegicus</i>
5701R	Stress-induced phosphoprotein1 (a)	gij13277819	63 / 6.45	63 / 6.40	34%	21	<0.0001	<i>M. musculus</i>
5706R	Stress-induced-phosphoprotein1 (b)	gij57099701	62 / 6.55	63 / 6.40	23%	13	<0.0001	<i>C. familiaris</i>
8107	$\alpha$ -crystallin, beta subunit	A39608	21 / 7.85	20 / 6.76	32%	7	<0.0001	<i>M. musculus</i>

<sup>1</sup> Spot label

<sup>2</sup> Protein names and Accession numbers were taken from the NCBI database

<sup>3</sup> Mw and pI, both theoretical (recorded in the NCBI database) and estimated (calculated from the spot position on the gel)

<sup>4</sup> Number of peptides that matched the protein sequence, total percentage of sequence coverage and the species for which sequence was matched

<sup>5</sup> p-value from GLM analysis, significant level is 5%

**Fgt:** protein fragment

Table 2. Proteins differentially expressed between the four muscles (continued)

SSP <sup>1</sup>	Protein ID <sup>2</sup>	Accession number <sup>2</sup>	Mw kDa/ pI obs <sup>3</sup>	Mw kDa/ pI theo <sup>3</sup>	% cover <sup>4</sup>	Matched Peptide <sup>4</sup>	p < 0.05 <sup>5</sup>	Species <sup>4</sup>
5617R	Aldehyde dehydrogenase	gij57526379	55 / 6.75	55 / 6.37	36%	14	<0.0001	<i>O. aries</i>
3619R	Antiquitin 1 (a)	gij25108887	55 / 6.2	55 / 6.24	21%	10	<0.0001	<i>H. sapiens</i>
3601R	Antiquitin 1(b)	gij25108887	55 / 5.8	55 / 6.24	22%	13	<0.0001	<i>H. sapiens</i>
7220R	Glutathione S-transferase Pi (a)	gij404	27 / 7.2	24 / 6.89	48%	7	<0.0001	<i>B. taurus</i>
7118R	Glutathione S-transferase Pi (b)	gij6013379	22 / 7.5	24 / 7.65	44%	5	<0.0001	<i>C. hircus</i>
5305R	Haloacid dehalogenase-like hydrolase	gij14149777	35 / 6.6	28.5 / 5.84	41%	10	<0.0001	<i>H. sapiens</i>
5207R	Peroxiredoxin 6	gij27807167/NP_777068	31 / 6.7	25 / 6.00	73%	17	<0.0001	<i>B. taurus</i>
3107R	SP22 (a)	gij627764	26 / 6.05	22 / 5.72	22%	4	<0.0001	<i>B. taurus</i>
4202R	SP22 (b)	gij627764	28 / 6.15	22 / 5.72	37%	6	<0.0001	<i>B. taurus</i>
7006R	Ubiquitin	gij51701909	9 / 7.5	8.6 / 6.56	19%	7	<0.0001	<i>O. aries</i>
3710R	Seryl-aminoacyl-tRNA synthetase 1	gij14250361/gij33468931	62 / 6.0	61 / 7.13	33%	14	<0.0001	<i>M. musculus</i>
1720R	Alpha-1-antitrypsin	gij57526646	60 / 5.0	46 / 5.83	26%	11	<0.0001	<i>O. aries</i>
5307R	20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase	gij2201516/gij265404	40.5 / 6.55	37.3 / 5.90	53%	11	<0.0001	<i>B. taurus</i>

<sup>1</sup> Spot label

<sup>2</sup> Protein names and Accession numbers were taken from the NCBI database

<sup>3</sup> Mw and pI, both theoretical (recorded in the NCBI database) and estimated (calculated from the spot position on the gel)

<sup>4</sup> Number of peptides that matched the protein sequence, total percentage of sequence coverage and the species for which sequence was matched

<sup>5</sup> p-value from GLM analysis, significant level is 5%

**Fgt:** protein fragment

Table 3. Muscle effect on protein expression

SSP <sup>1</sup>	Protein ID <sup>2</sup>	Muscles <sup>3</sup>			
		LD	SM	TL	VM
<i>Glycolytic metabolism</i>					
7530R	Creatine Kinase M	1100±189 <sup>a</sup>	2127±268 <sup>b</sup>	2526±373 <sup>b</sup>	2757±255 <sup>b</sup>
7202R	Creatine kinase M <b>fgt</b>	3269 ±1237 <sup>a</sup>	5337±886 <sup>b</sup>	2640±769 <sup>a</sup>	3304±617 <sup>a</sup>
7409R	Enolase 3 (a)	791±299 <sup>a</sup>	1609±257 <sup>b</sup>	608±258 <sup>a</sup>	563±267 <sup>a</sup>
6407R	Enolase 3 (b)	1047±248 <sup>a</sup>	1688±270 <sup>b</sup>	1020±284 <sup>a</sup>	547±156 <sup>a</sup>
6607R	Enolase alpha	189±22 <sup>a</sup>	271±32 <sup>b</sup>	325±52 <sup>b</sup>	294±47 <sup>b</sup>
6307R	Fructose-1,6-bisphosphatase 2	1974±180 <sup>a</sup>	2547±217 <sup>b</sup>	1390±233 <sup>a</sup>	1625±142 <sup>a</sup>
6203R	Glycogen phosphorylase (a) <b>fgt</b>	361±174 <sup>a</sup>	940±160 <sup>b</sup>	410±158 <sup>a</sup>	318±113 <sup>a</sup>
6207R	Glycogen phosphorylase (b) <b>fgt</b>	457±231 <sup>a</sup>	1128±168 <sup>b</sup>	463±197 <sup>a</sup>	405±128 <sup>a</sup>
6005R	Lactate Dehydrogenase A <b>fgt</b>	5139±457 <sup>a</sup>	6101±433 <sup>b</sup>	4403±507 <sup>a</sup>	4938±352 <sup>a</sup>
7617R	Pyruvate Kinase	1139±175 <sup>a</sup>	1660±173 <sup>a</sup>	1684±59 <sup>a</sup>	3056±461 <sup>b</sup>
8702R	Pyruvate kinase, isoform M1 (a)	393±106 <sup>a</sup>	676±210 <sup>a</sup>	1106±138 <sup>a</sup>	458±115 <sup>b</sup>
8609R	Pyruvate Kinase, isoform M1(b)	313±84 <sup>a</sup>	964±212 <sup>b</sup>	418±106 <sup>a</sup>	320±125 <sup>a</sup>
5515R	Pyruvate kinase 3, isoform 2 <b>fgt</b>	238±34 <sup>a</sup>	236±38 <sup>a</sup>	349±29 <sup>b</sup>	192±26 <sup>a</sup>
5437R	Pyruvate kinase 3, isoform 1 <b>fgt</b>	625±253 <sup>a</sup>	1165±274 <sup>b</sup>	387±151 <sup>a</sup>	331±168 <sup>a</sup>
6205R	Triosephosphate isomerase 1 (a)	5613±518 <sup>a</sup>	4088±647 <sup>b</sup>	3796±528 <sup>b</sup>	3593±467 <sup>b</sup>
6206R	Triosephosphate isomerase 1 (b)	7128±117 <sup>a</sup>	4560±734 <sup>b</sup>	4825±364 <sup>b</sup>	5120±650 <sup>b</sup>
<i>Oxidative metabolism</i>					
3614R	Dlst protein, dihydrolipoamide S-succinyltransferase	865±92 <sup>a</sup>	891±143 <sup>a</sup>	517±51 <sup>b</sup>	1120±140 <sup>a</sup>
6302R	Malate dehydrogenase (a)	3878±486 <sup>a</sup>	5061±538 <sup>a</sup>	4676±277 <sup>a</sup>	6185±321 <sup>b</sup>
5308R	Malate dehydrogenase (b)	336±36 <sup>a</sup>	770±83 <sup>b</sup>	451±79 <sup>a</sup>	817±83 <sup>b</sup>
3208R	NADH dehydrogenase 24 kDa subunit	119±19 <sup>a</sup>	147±36 <sup>a</sup>	198±33 <sup>a</sup>	428±57 <sup>b</sup>
3501R	Succinate-CoA ligase	1155±405 <sup>a</sup>	1895±375 <sup>a</sup>	693±192 <sup>b</sup>	1279±208 <sup>a</sup>
2611R	Ubiquinol-cytochrome c reductase	243±31 <sup>a</sup>	198±37 <sup>a</sup>	115±17 <sup>b</sup>	270±41 <sup>a</sup>
<i>Contractile apparatus</i>					
1509R	Actin, skeletal muscle	137±76 <sup>a</sup>	141±57 <sup>a</sup>	209±72 <sup>a</sup>	1103±724 <sup>b</sup>
1008R	Parvalbumin $\alpha$	119±20 <sup>a</sup>	457±118 <sup>b</sup>	10835±1567 <sup>c</sup>	4951±915 <sup>d</sup>

<sup>1</sup> Spot label

<sup>2</sup> Protein names were taken from the NCBI database

<sup>3</sup> Means and SEM of the LD, *longissimus dorsi* (N = 5); SM, *semimembranosus* (N = 5); TL, *tensor fasciae latae* (N = 5); VM, *vastus medialis* (N = 4)

<sup>abcd</sup> On a same line, means with different superscripts differ (P < 0.05), if two means have the same superscript they are not significantly different

**Fgt:** protein fragment

Table 3. Muscle effect on protein expression (continued)

SSP <sup>1</sup>	Protein ID <sup>2</sup>	LD <sup>3</sup>	SM <sup>3</sup>	TL <sup>3</sup>	VM <sup>3</sup>
<i>Transport</i>					
7206R	Carbonate dehydratase II	3892±537 <sup>a</sup>	4652±543 <sup>a</sup>	2598±609 <sup>b</sup>	4000±836 <sup>a</sup>
2007	FABP-H (a)	4716±452 <sup>a</sup>	9376±1221 <sup>b</sup>	3522±506 <sup>a</sup>	10394±470 <sup>b</sup>
3002R	FABP-H (b)	673±166 <sup>a</sup>	2407±416 <sup>b</sup>	629±170 <sup>a</sup>	4395 ±637 <sup>c</sup>
7009R	Myoglobin	194±49 <sup>a</sup>	778±157 <sup>b</sup>	381±117 <sup>c</sup>	1135±75 <sup>d</sup>
<i>Stress regulator</i>					
3106R	DJ-1 protein	704±50 <sup>a</sup>	925±66 <sup>a</sup>	1021±104 <sup>a</sup>	1308±173 <sup>b</sup>
5206R	HSP-27, heat shock protein 27kDa	2062±856 <sup>a</sup>	1263±449 <sup>a</sup>	236±105 <sup>b</sup>	2006±874 <sup>a</sup>
2702R	HSP-60, heat-shock protein 60kDa	820±99 <sup>a</sup>	974±192 <sup>a</sup>	862±153 <sup>a</sup>	1590±159 <sup>b</sup>
5701R	Stress-induced phosphoprotein 1 (a)	202±39 <sup>a</sup>	354±66 <sup>b</sup>	408±11 <sup>b</sup>	462±9 <sup>b</sup>
5706R	Stress-induced-phosphoprotein 1 (b)	475±57 <sup>a</sup>	607±121 <sup>a</sup>	523±74 <sup>a</sup>	837±80 <sup>b</sup>
8107	α-crystallin, beta subunit	1010±600 <sup>a</sup>	1291±690 <sup>a</sup>	73±7 <sup>b</sup>	1539±947 <sup>a</sup>
<i>Detoxification</i>					
5617R	Aldehyde dehydrogenase	788±106 <sup>a</sup>	893±103 <sup>a</sup>	1155±98 <sup>a</sup>	1777±89 <sup>b</sup>
3619R	Antiquitin 1 (a)	601±107 <sup>a</sup>	877±110 <sup>b</sup>	954±106 <sup>b</sup>	1129±65 <sup>b</sup>
3601R	Antiquitin 1(b)	520±67 <sup>a</sup>	664±51 <sup>b</sup>	801±43 <sup>c</sup>	1020±57 <sup>d</sup>
7220R	Glutathione S-transferase Pi (a)	361±87 <sup>a</sup>	444±61 <sup>a</sup>	690±166 <sup>a</sup>	1200±67 <sup>b</sup>
7118R	Glutathione S-transferase Pi (b)	54±24 <sup>a</sup>	114±38 <sup>a</sup>	125±46 <sup>a</sup>	326±90 <sup>b</sup>
5305R	Haloacid dehalogenase-like hydrolase	230±28 <sup>a</sup>	404±69 <sup>b</sup>	352±28 <sup>b</sup>	414±67 <sup>b</sup>
5207R	Peroxiredoxin 6	2084±214 <sup>a</sup>	3624±256 <sup>b</sup>	3525±473 <sup>b</sup>	4177±170 <sup>b</sup>
3107R	SP22 (a)	303±62 <sup>a</sup>	339±56 <sup>a</sup>	151±34 <sup>a</sup>	546±140 <sup>b</sup>
4202R	SP22 (b)	2000±226 <sup>a</sup>	2070±104 <sup>a</sup>	783±124 <sup>b</sup>	2095±280 <sup>a</sup>
7006R	Ubiquitin	218±30 <sup>a</sup>	350±53 <sup>b</sup>	380±63 <sup>b</sup>	468±16 <sup>b</sup>
<i>Protein synthesis</i>					
3710R	Seryl-aminoacyl-tRNA synthetase 1	106±12 <sup>a</sup>	170±19 <sup>b</sup>	215±48 <sup>b</sup>	246±29 <sup>b</sup>
<i>Miscellaneous</i>					
1720R	Alpha-1-antitrypsin	879±263 <sup>a</sup>	1312±274 <sup>a</sup>	2638±327 <sup>b</sup>	1519±205 <sup>a</sup>
5307R	20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase	763±151 <sup>a</sup>	1216±122 <sup>b</sup>	380±71 <sup>c</sup>	1505±221 <sup>d</sup>

<sup>1</sup> Spot label

<sup>2</sup> Protein names were taken from the NCBI database

<sup>3</sup> Means and SEM of the LD, *longissimus dorsi* (N = 5); SM, *semimembranosus* (N = 5); TL, *tensor faciae latae* (N = 5); VM, *vastus medialis* (N = 4)

<sup>abcd</sup> On a same line, means with different superscripts differ (P < 0.05), if two means have the same superscript they are not significantly different

**Fgt:** protein fragment

## Legends

Figure 1. Representative 2-D gel map of muscle sarcoplasmic proteins. The differentially expressed proteins in the four muscles are encircled (spots corresponding to fragments are not shown). Abbreviations: 20  $\alpha$ -HSD: 20  $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase; A1AT:  $\alpha$ -1-antitrypsin; Ald-DH: aldehyde dehydrogenase; Aq: Antiquitin 1; CarbII: Carbonate dehydratase II; CK-M: Creatine kinase M; Cyt-c: ubiquinol-cytochrome c reductase; DJ-1: DJ-1 protein; Eno: Enolase; Eno3: Enolase 3; FABP-H: Fatty acid binding protein; GST- $\pi$ : Glutathione S-transferase class Pi; Hdh: Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 2; HSP27: Heat shock protein 27 kDa; HSP60: Heat shock protein 60 kDa; MDH: Malate dehydrogenase; Myogb: Myoglobin; NADH-DH: NADH dehydrogenase, 24kDa subunit; Parv- $\alpha$ : Parvalbumin  $\alpha$ ; PK: Pyruvate kinase; PRX6: Peroxiredoxin 6; SARS: Seryl-aminoacyl-tRNA synthetase 1; SCoA-L: Succinate-CoA Ligase; SP22: Substrate protein of mitochondrial ATP-dependant proteinase; STI-1: Stress induced phosphoprotein 1; TPI: Triosephosphate isomerase 1; Ub: Ubiquitin;  $\alpha$ -crist:  $\alpha$ -Crystallin, beta subunit.

Figure 2. Expression profiles of the most representative proteins differentially-expressed between muscles. Each bar represents the mean spot volume values (ppm) from 5 animals in LD, *longissimus dorsi*; SM, *semimembranosus*, TL, *tensor faciae latae*, and 4 animals in VM, *vastus medialis* muscles. Letters a, b, c and d indicate differences between muscles significant at  $p < 0.05$ , if two means have the same letter they are not significantly different.

Figure 1.

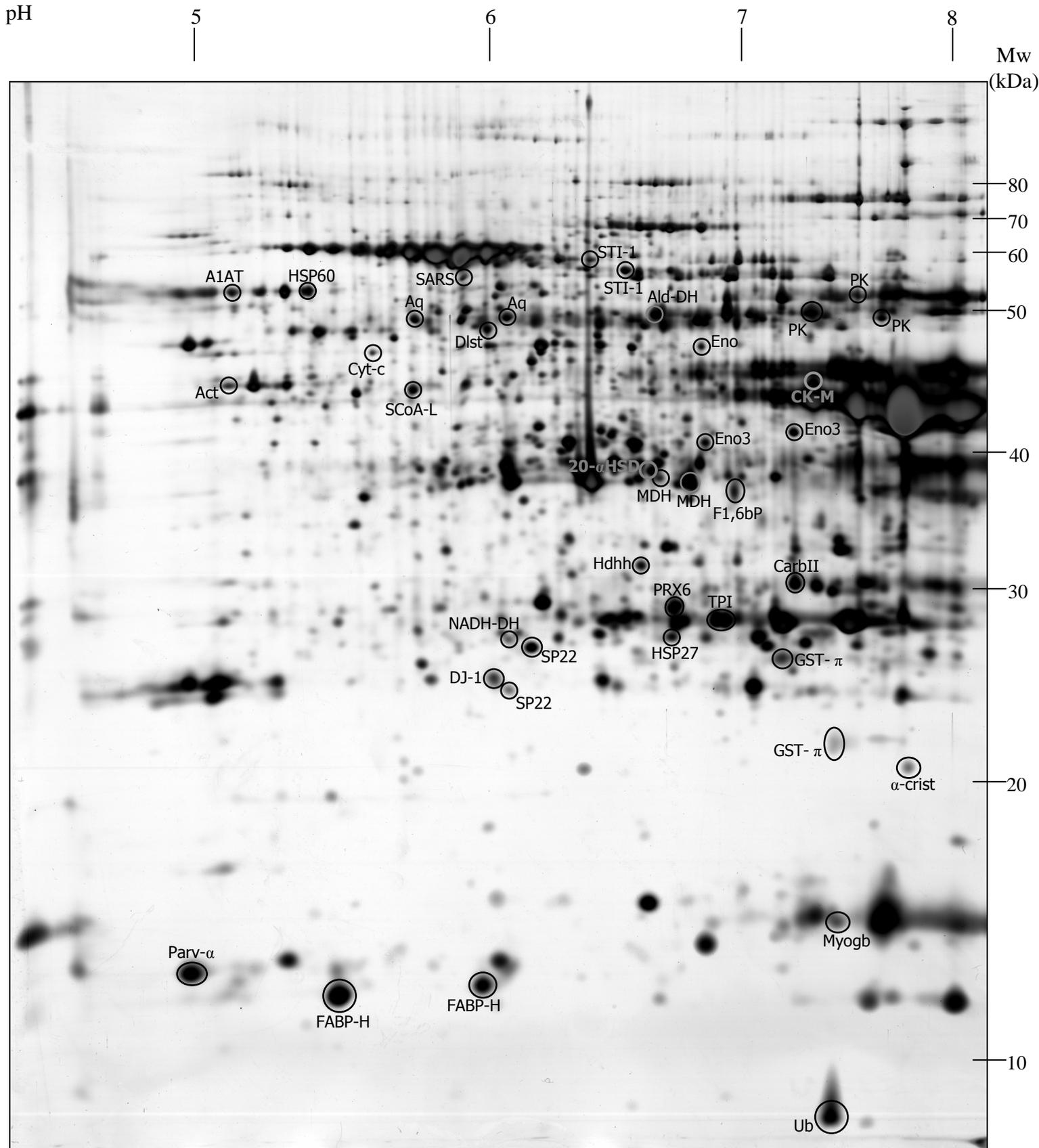
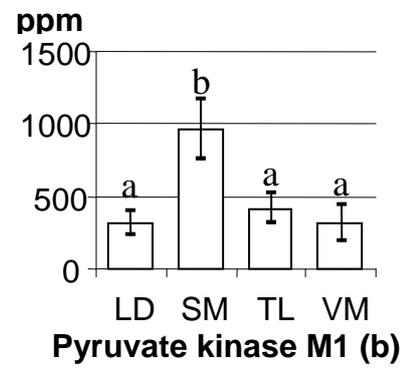
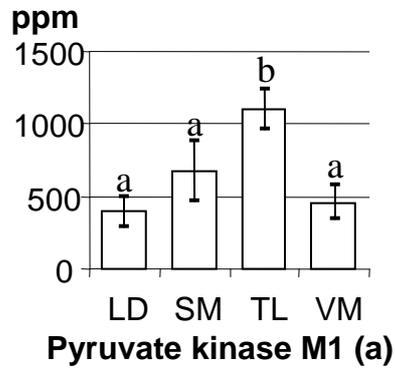
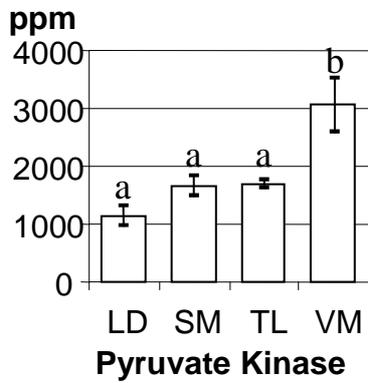
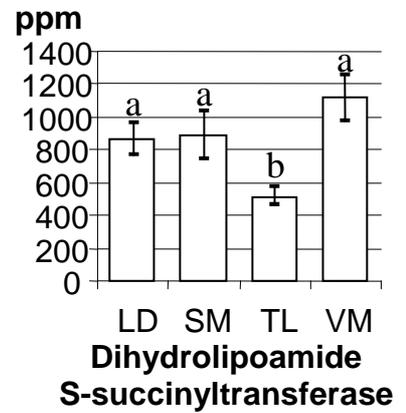
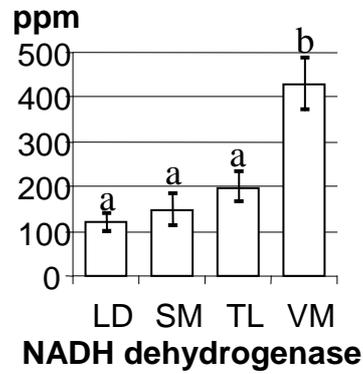
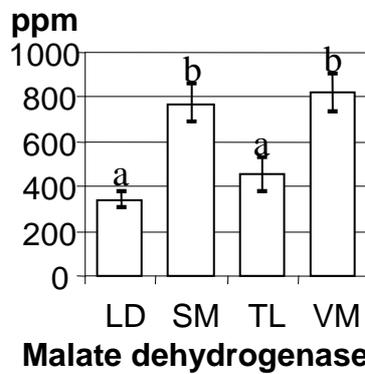


Figure 2.

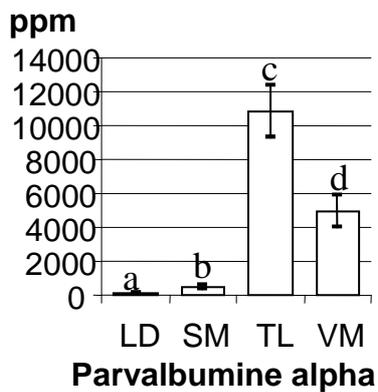
Glycolytic metabolism-related proteins



Oxidative metabolism-related proteins



Contractile-associated protein



Oxidative metabolism-related proteins: Transport proteins

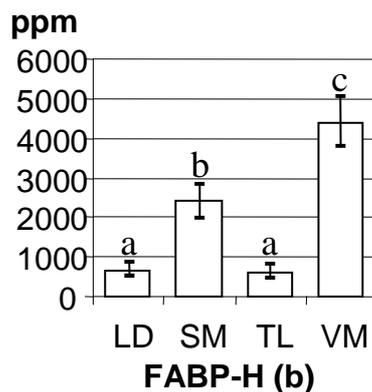
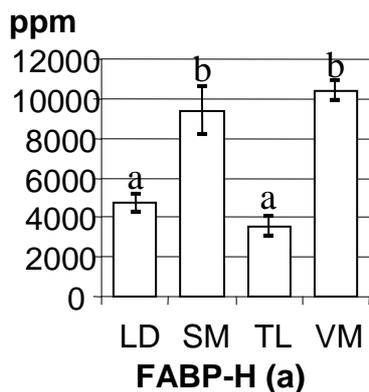
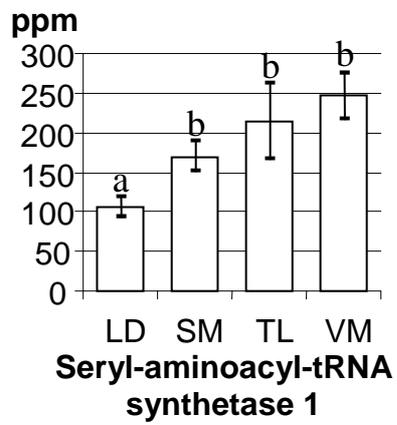
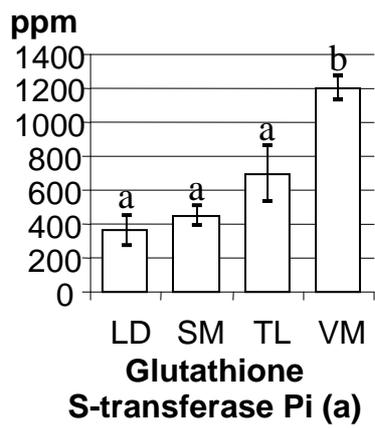


Figure 2 (continued)

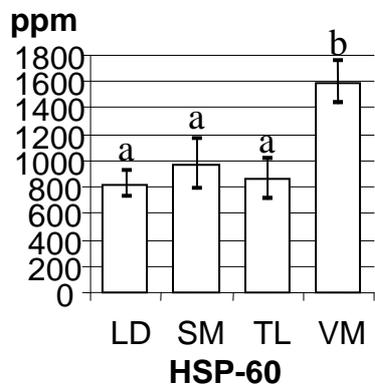
## Protein synthesis



## Oxidative metabolism-related protein: detoxification



## Oxidative metabolism-related protein: Chaperone



## CONCLUSIONS DE L'ARTICLE

Nous avons comparé l'expression des protéines sarcoplasmiques de quatre muscles (VM, SM, LD et TL) relativement riches en fibres rapides. Grâce à la technique de fractionnement nous avons pu mettre en évidence des protéines impliquées dans la régulation du stress (aldéhyde déshydrogénase, GST-Pi, peroxyredoxines...), dans les voies de signalisations cellulaires (ubiquitine) et même dans la transcription.

Le muscle qui se différencie le plus est le VM, 17 protéines (dont 16 surexprimées) le distinguent des 3 autres muscles. Il présente le taux le plus élevé d'enzymes du métabolisme oxydatif et de protéines impliquées dans la régulation du stress oxydant et également un turnover protéique plus élevé, alors que les enzymes du métabolisme glycolytique ne présentent pas de différence d'expression par rapport au LD et au TL. Le muscle qui se différencie le moins est le SM, 9 spots sont différentiellement exprimés des autres muscles. Il présente une expression intermédiaire des enzymes impliquées dans les métabolismes glycolytique et oxydatif. Sa caractéristique principale est qu'il présente le plus grand nombre de fragments protéiques. Le TL a la plus faible expression d'enzymes oxydatives. Il est à noter que les enzymes classées comme "associées au métabolisme oxydatif" ont une expression assez élevée dans ce muscle (excepté HSP-27 et l' $\alpha$ -crystalline) suggérant que la plupart des protéines de stress ne sont pas spécifiques du métabolisme oxydatif. Quant au LD il possède un profil d'expression intermédiaire des autres muscles tant au niveau des enzymes du métabolisme glycolytique que de celles du métabolisme oxydatif et il présente un taux relativement faible de protéines liées au stress suggérant que dans le LD, relativement riche en fibres IIA, le stress dû au métabolisme est moins marqué que dans les autres muscles.

Cette étude sur les différences de protéome sarcoplasmique des muscles au sein d'un génotype nous a permis de visualiser une spécificité musculaire de certaines isoformes protéiques. Telle l'expression préférentielle de l'enolase 3 (b) et de la pyruvate kinase M1 (b) dans le SM, de même pour l'expression de la pyruvate kinase M1 (a) dans le TL et l'expression spécifique de la pyruvate kinase, de la FABP-H (b), de la protéine SP22 (a) et de STI-1 (b) dans le VM. L'expression de ces différentes isoformes permettrait, comme les types de myosine, de classer les muscles les uns par rapport aux autres. D'ailleurs l'expression d'isoformes spécifiques dans le VM qui est, des quatre muscles, le plus riche en fibres de type I, suggère que ces isoformes pourraient être reliées aux fibres de type I; l'étude d'autres muscles riches en fibres de type I permettrait de vérifier cette hypothèse.

Ainsi cette étude montre bien la diversité d'expression dans les muscles, le type de myosine n'est sans doute pas le seul élément à prendre en compte dans la classification, et il

serait intéressant de poursuivre cette étude sur des muscles plus extrêmes encore tel le *supraspinatus* ou le *vastus intermedius* qui sont des muscles composés presque exclusivement de fibres lentes de type I.

Ces résultats permettent de supposer que ces différents muscles ne réagissent pas de la même façon et qu'ils ne seront pas affectés au même niveau par un stress, comme, par exemple, un stress lié aux procédures d'abattage; et par conséquent, l'influence de ce stress sur les qualités de la viande serait différente d'un muscle à l'autre.

Par ailleurs, il est probable qu'une mutation affectant le métabolisme oxydatif aurait plus de répercussions sur le LD et surtout sur le VM que sur le TL et inversement une mutation affectant le métabolisme glycolytique serait plus marquée dans le SM et le TL que dans le VM.

## CHAPITRE II. EFFET DU GENOTYPE TEXEL SUR LE PROTEOME MUSCULAIRE

### I. L'EFFET DU GENOTYPE "TEXEL" SUR LES DIFFERENCES INTERMUSCULAIRES

Dans cette étude nous avons réalisé la comparaison des différences d'expression protéique entre les quatre muscles. Cependant à la différence du Chapitre précédent (Chap I.) cette comparaison est réalisée sur l'ensemble des animaux, c'est-à-dire TT et RR. Cette étude est réalisée uniquement sur les spots différentiellement exprimés et identifiés lors de l'analyse des muscles des animaux de génotype RR seuls.

Le but de cette analyse (ANOVA entre les muscles) est de montrer comment l'introduction du génotype Texel modifie les différences musculaires.

Sur les 47 protéines identifiées dans l'analyse RR seuls 29 présentent encore des différences d'expression en fonction du type musculaire (Tableau 4, Figure 21).

Dans cette analyse, nous observons moins de fragments protéiques différentiellement représentés. Sur les 6 fragments mis en évidence au cours de l'analyse sur les individus RR seul un fragment de créatine kinase reste majoritairement exprimé dans le muscle SM.

#### *Métabolisme glycolytique*

Sur les 16 spots liés au métabolisme glycolytique et précédemment identifiés comme étant associés aux types musculaires, 7 présentent encore des différences d'expression dans les muscles des agneaux des deux génotypes confondus. Les six spots de protéines entières correspondent à trois protéines différentes: Créatine kinase, Enolase et Pyruvate kinase. Il ne reste qu'un seul fragment de créatine kinase qui présente une différence d'expression liée au muscle. Ces sept spots ont des profils d'expression musculaire similaires à ceux observés dans l'analyse sur les muscles RR. Toutefois le nombre plus important d'individus inclus dans cette étude permet d'accentuer certaines différences intermusculaires. Les spots de triose phosphate isomérase, de glycogène phosphorylase et de fructose 1,6 biphosphatase ne présentent plus de différence d'expression intermusculaire.

#### *Métabolisme oxydatif*

Comme pour les spots associés au métabolisme glycolytique seuls 3 spots sur 6 présentent encore une différence d'expression musculaire. Ces 3 spots, la succinate CoA ligase, l'ubiquinol cytochrome c reductase et la dihyrolipoamide S-succinyl transférase, présentent également des profils d'expression musculaire similaires à ceux observés dans l'étude sur les

seuls animaux RR. Les spots dont l'expression ne présente plus de différence correspondent à la malate déshydrogénase et à la NADH déshydrogénase.

### *Protéines associées à l'appareil contractile*

L'expression de la parvalbumine et de l'actine reste similaire à celle observée dans l'analyse sur les muscles RR.

### *Protéines associées au métabolisme oxydatif*

Les 4 spots impliqués dans le transport et le trafic intracellulaire - la carbonate déshydratase II, la myoglobine et les 2 isoformes de FABP-H – ont tous conservé des profils d'expression similaires à ceux observés dans l'analyse sur les muscles des individus RR seuls.

Parmi les protéines de type chaperonne seules 3 sur 7 présentent encore des différences. Pour DJ-1, HSP-60 et l'ubiquitine les profils d'expression sont restés similaires. La disparition des différences observées pour HSP-27, STI-1 et l' $\alpha$ -crystalline laisse toutefois supposer une augmentation du stress intracellulaire associée au génotype TT.

Comme pour les chaperonnes, les protéines associées à la détoxification sont moins nombreuses à présenter des différences. Sur les 9 spots identifiés sur les muscles RR six, correspondant à quatre protéines, présentent encore des différences. Ce sont l'antiquitine (2 isoformes), la GST-Pi (2 isoformes) et la protéine SP22 (2 isoformes). Globalement leurs profils d'expression sont similaires à ceux de l'analyse sur les muscles RR. Il semblerait que dans les muscles TT la demande en antioxydant soit plus importante que dans les muscles RR.

### *Synthèse protéique*

Finalement nous conservons une différence d'expression de la seryl-aminoacyl-tRNA synthetase impliquée dans la synthèse des protéines. Son profil d'expression est, lui aussi, similaire à celui observé lors de l'analyse sur les muscles des RR.

### *Conclusions*

Cette étude des différences musculaires des agneaux tous génotypes confondus nous a permis de mettre en évidence certaines protéines marqueurs du type musculaire. Ces protéines conservent des profils d'expression similaires quel que soit le génotype. L'expression de certaines protéines dont les différences musculaires n'étaient que légèrement marquées dans l'analyse sur les muscles RR ne se distingue plus d'un muscle à l'autre. D'autres protéines semblent quant à elles être réellement influencées par le génotype, ainsi la disparition des différences d'expression musculaire des chaperonnes et des protéines de détoxification semble pointer une augmentation du stress cellulaire associée au

génotype TT. Ces protéines qui étaient principalement représentées dans le VM se retrouvent dans tous les muscles. De même l'absence de différence d'expression d'une majorité de spots liés au métabolisme glycolytique tend à conforter l'idée que le métabolisme musculaire des individus TT est plus glycolytique.

Tableau 4. Spots protéiques variant entre les quatre muscles des individus des deux génotypes combinés.

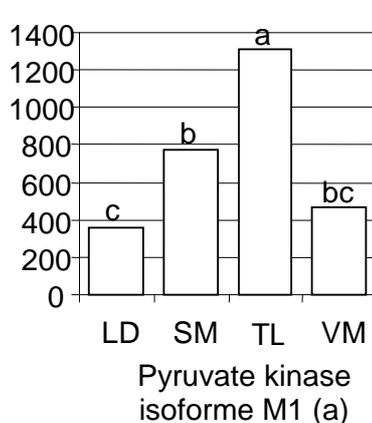
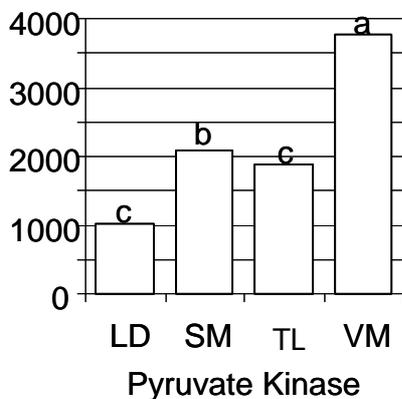
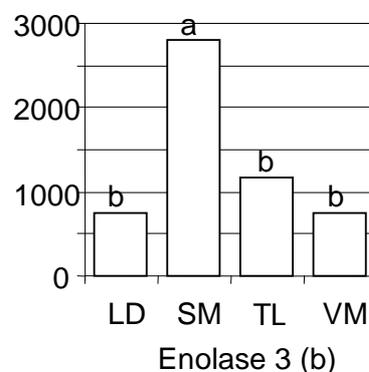
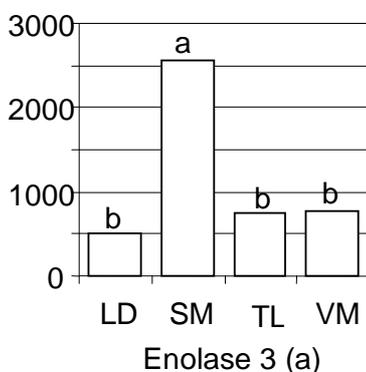
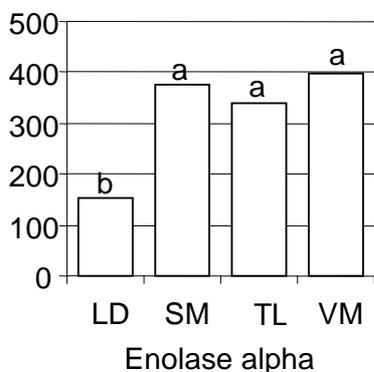
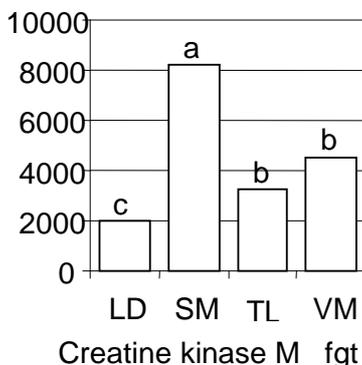
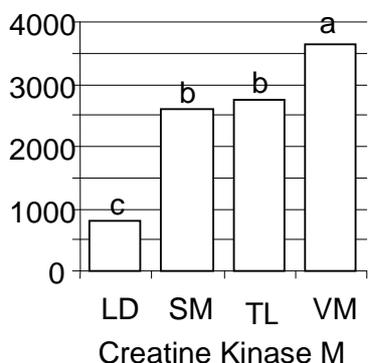
SSP	accession n°	ID		Mr kDa/ pl obs	Mr kDa/ pl theo	VM	TL	SM	LD
<i>Métabolisme Glycolytique</i>									
7530R	gi 4838363	Creatine kinase M	<i>Bos taurus</i>	46 / 7.25	43 / 6.63	3644 a	2753 b	2590 b	813 c
7202R	gi 4838363	Creatine kinase M <b>fgt</b>	<i>Bos taurus</i>	29 / 7.1	43 / 6.63	4538 b	3223 b	8208 a	1987 c
7409R	gi 7331113	Enolase 3 (a)	<i>Ovis aries</i>	45 / 7.3	47 / 7.58	774 b	753 b	2569 a	506 b
6407R	gi 56206033/gi 57164373	Enolase 3 (b)	<i>Mus musculus</i>	45 / 6.8	69 / 5.80	755 b	1175 b	2792 a	744 b
6607R	gi 57086919/gi 27806645	Enolase alpha	<i>Canis familiaris</i>	50 / 6.9	47 / 6.44	398 a	341 a	375 a	152 b
7617R	gi 1177221	Pyruvate kinase	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	56 / 7.3	58 / 7.2-7.96	3762 a	1878 bc	2081 b	1011 c
8702R	gi 89089	Pyruvate kinase isoform M1 (a)	<i>Felis catus</i>	60 / 7.5	58 / 7.2-7.96	463 bc	1308 a	773 b	356 c
<i>Métabolisme Oxydatif</i>									
3614R	gi 23271834	Dlstr protein, dihydrolipoamide S-succinyltransferase	<i>Mus musculus</i>	53 / 6.15	22 / 6.43	1487 a	586 c	1245 ab	827 bc
3501R	gi 55957255/gi 55957259	Succinate-CoA ligase, ADP-forming, beta subunit	<i>Homo sapiens</i>	46.5 / 5.8	48 / 6.65	2036 a	691 b	2309 a	905 b
2611R	gi 27807137	Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I	<i>Bos taurus</i>	50 / 6.7	53 / 5.94	334 a	103 c	251 ab	187 bc
<i>Protéines associées à l'appareil contractile</i>									
1509R	gi 71611	Actin, skeletal muscle	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	47 / 5.1	42 / 5.31	1844 a	296 b	170 b	269 b
1008R	gi 131103	Parvalbumin $\alpha$	<i>Ovis aries</i>	12 / 4.9	12 / 4.98	6789 b	12314 a	732 c	18 c
<i>Protéines associées au métabolisme Oxydatif : protéine de transport</i>									
7206R	gi 68289	Carbonate hydratase II	<i>Ovis aries</i>	32 / 7.4	29 / 6.41	5441 ab	3286 b	6500 a	3485 b
2007	Q8HY78/ gi 26000692	FABP-H (a)	<i>Ovis aries</i>	11.5 / 5.5	15 / 6.11	14149 a	3835 b	12009 a	3669 b
3002R	Q8HY78/ gi 26000691	FABP-H (b)	<i>Ovis aries</i>	11.5 / 6.0	15 / 6.11	5739 a	585 c	2867 b	502 c
7009R	gi 70563	Myoglobin	<i>Ovis aries</i>	15 / 7.3	17 / 6.94	1392 a	401 b	998 a	218 b
<i>Protéines associées au métabolisme Oxydatif : détoxification</i>									
3619R	gi 25108887	Antiquitin 1 (a)	<i>Homo sapiens</i>	55 / 6.2	55 / 6.24	1597 a	1009 b	1213 ab	572 c
3601R	gi 25108887	Antiquitin 1 (b)	<i>Homo sapiens</i>	55 / 5.8	55 / 6.24	1445 a	898 b	873 b	490 c
7220R	gi 404	Glutathione S-transferase Pi, GST-Pi	<i>Bos taurus</i>	27 / 7.2	24 / 6.89	1422 a	822 b	544 bc	353 c
7118R	gi 6013379	Glutathione S-transferase Pi, GST-Pi	<i>Capra hircus</i>	22 / 7.5	24 / 7.65	349 a	162 ab	108 b	27 b
3107R	gi 627764	SP22 substrate protein of mitochondrial ATP-dependant proteinase (a)	<i>Bos taurus</i>	26 / 6.05	22 / 5.72	602 a	147 c	434 ab	266 bc
4202R	gi 627764	SP22 substrate protein of mitochondrial ATP-dependant proteinase (b)	<i>Bos taurus</i>	28 / 6.15	22 / 5.72	2430 a	897 c	2862 a	1572 b
<i>Protéines associées au métabolisme Oxydatif : Chaperone</i>									
3106R	gi 50513593/gi 59858513	DJ-1 protein	<i>Bos taurus</i>	25 / 6.0	20 / 6.84	1701 a	1218 b	1366 ab	647 c
2702R	gi 1334284	HSP-60, heat-shock protein 60kDa	<i>Rattus norvegicus</i>	60 / 5.4	61 / 5.71	2284 a	900 b	1432 ab	813 b
7006R	gi 51701909	Ubiquitin	<i>Ovis aries</i>	9 / 7.5	8.6 / 6.56	6791 a	5478 a	4946 a	1416 b
<i>Synthèse protéique</i>									
3710R	gi 14250361 / gi 33468931	Seryl-aminoacyl-tRNA synthetase 1	<i>Mus musculus</i>	62 / 6.0	61 / 7.13	332 a	260 a	252 ab	116 b

fgt: fragment protéique. a, b, c: différence significative  $p < 0,05$ .

Figure 21. Profils d'expression des protéines différemment exprimées.

Axe-x: muscles; Axe-y : intensité moyenne sur 10 animaux (5 RR et 5 TT), les unités sont en partie par million (ppm). Les lettres a, b, c, représentent une différence significative ( $p < 0,05$ ).

### Métabolisme Glycolytique



### Métabolisme Oxydatif

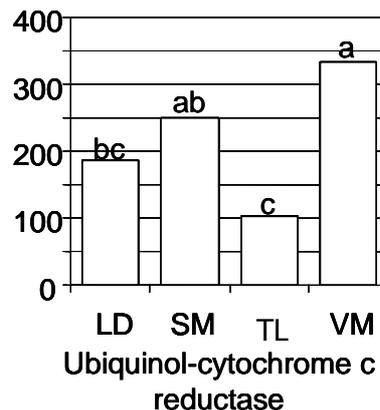
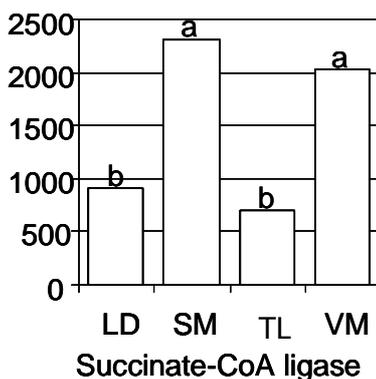
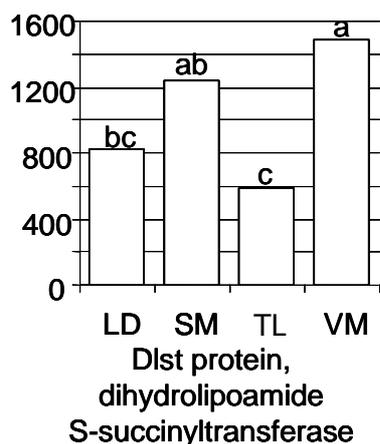
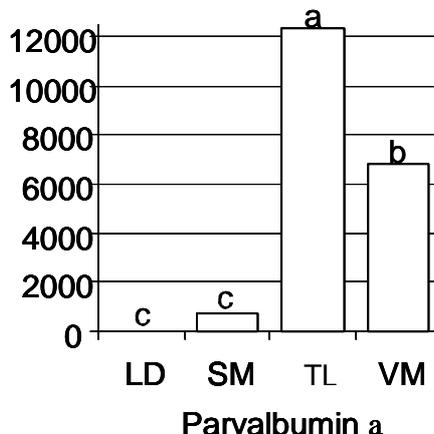
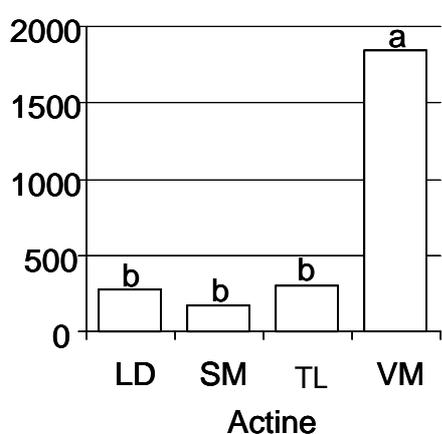


Figure 21. Suite.

Protéines associées à l'appareil contractile



Protéines associées au métabolisme oxydatif: protéines de transport

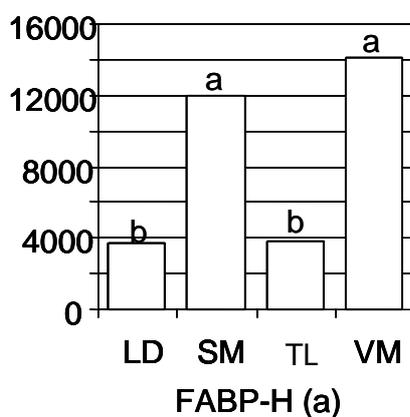
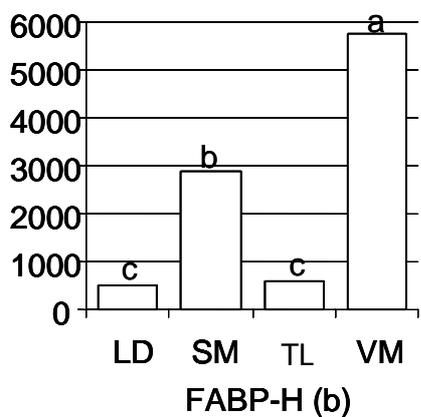
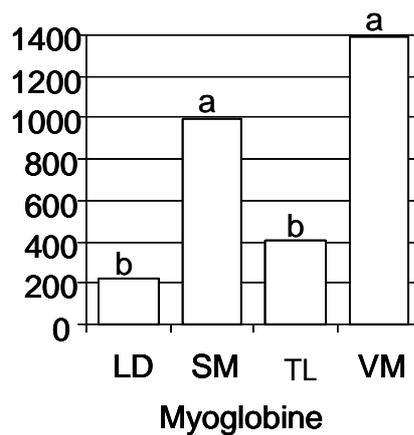
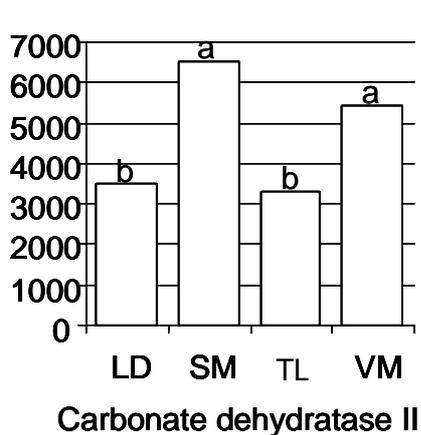
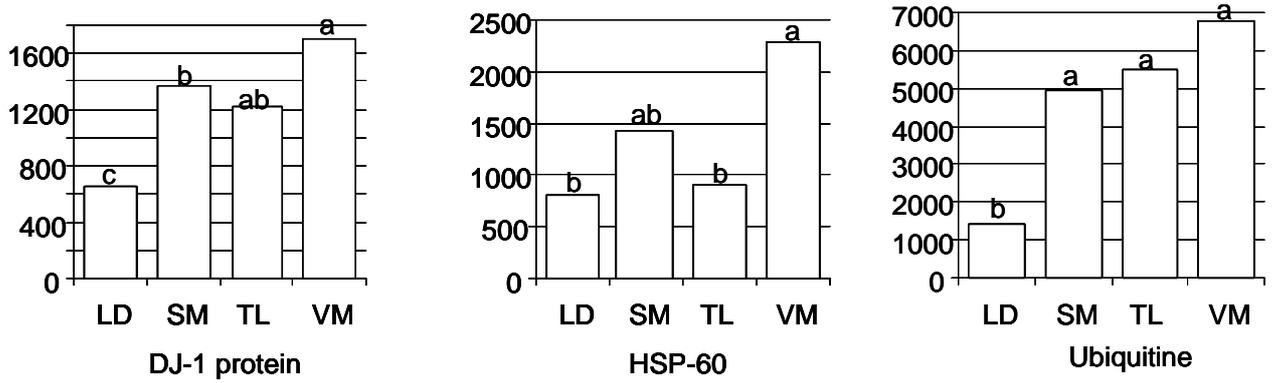
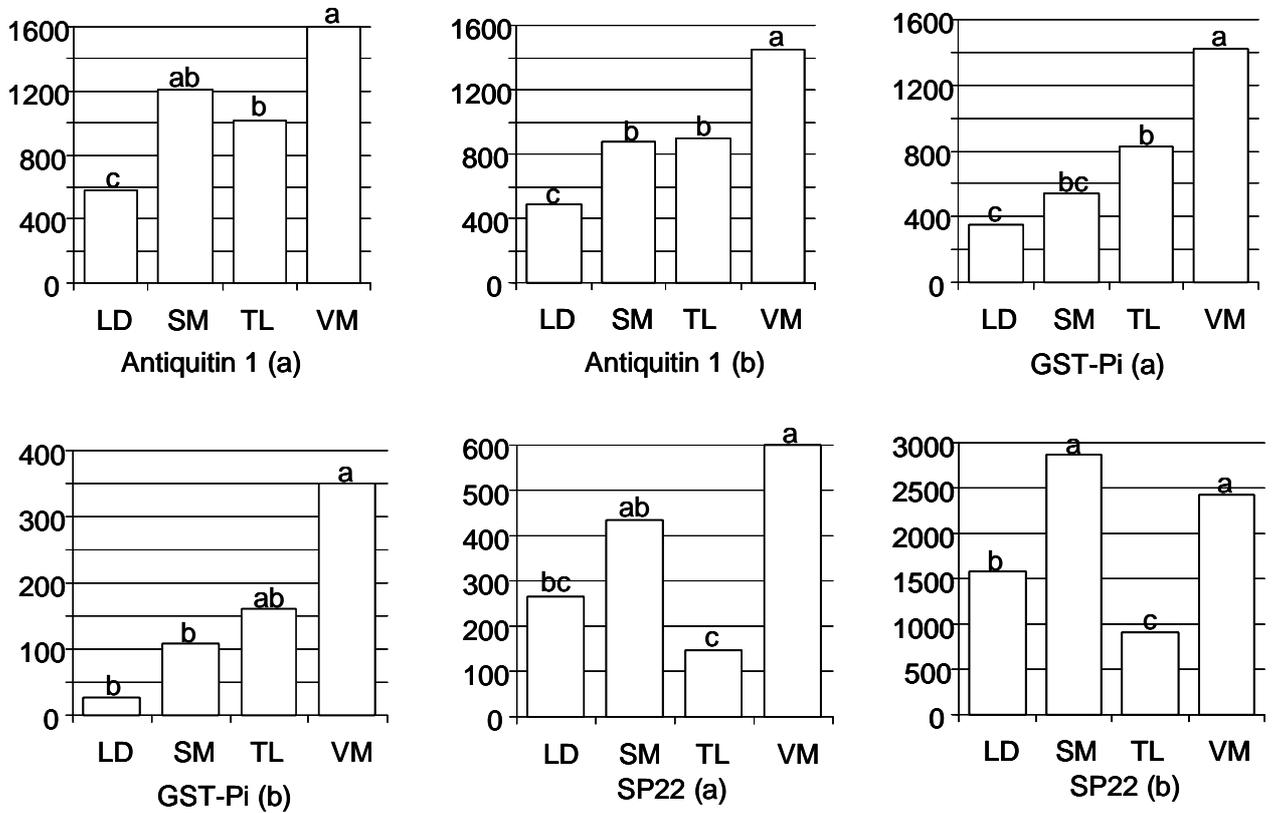


Figure 21. Suite.

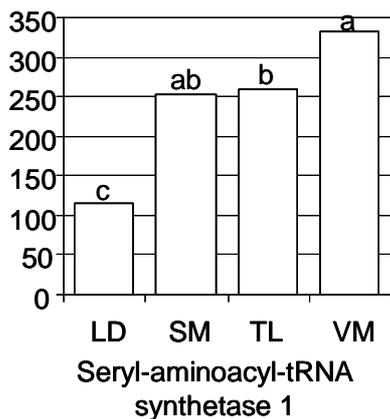
Protéines associées au métabolisme oxydatif: Chaperone



Protéines associées au métabolisme oxydatif: détoxification



Synthèse protéique



## II. EFFET DU GENOTYPE TEXEL SUR CHACUN DES MUSCLES: *PROTEOMIC ANALYSIS OF OVINE MUSCLE HYPERTROPHY*

Suite aux résultats du chapitre I sur les différences existant entre les différents muscles, nous avons, dans un premier temps, choisi d'étudier l'effet du génotype Texel sur chacun des quatre muscles séparément.

### *Introduction*

La race ovine Texel Belge présente un QTL (Quantitative Trait Locus) sur le chromosome 2 ayant un effet majeur sur le développement musculaire [1, 61]. Par ailleurs, l'hyper-développement musculaire des Texels belges ne semble pas associé à une dégradation des qualités de viandes. Au sein de ce QTL se trouve le gène de la myostatine et récemment Clop et al (2006) [2] ont décrit chez les Texel belge une mutation dans la région 3'-UTR du gène de la myostatine (région transcrite, mais non traduite). Cette mutation crée une séquence cible de reconnaissance par des micro-ARN (miARN), la formation d'un complexe double brin d'ARN (miARN fixé à sa séquence ARN cible) entraîne la dégradation de l'ARN messenger cible.

Les protéines qui sont les principaux constituants de la cellule musculaire déterminent les propriétés fonctionnelles et structurelles de la cellule, et contribuent aux qualités sensorielles de la viande. L'électrophorèse bidimensionnelle est un outil très intéressant pour l'étude de ces protéines, étant donné qu'elle permet de séparer des centaines de protéines en même temps. Jusqu'à présent peu d'études en électrophorèse bidimensionnelle ont porté sur les protéines sarcoplasmiques, elles constituent pourtant 30% du total des protéines du muscle et englobent la majorité des protéines du métabolisme énergétique et des voies de transduction du signal. Elles sont donc particulièrement intéressantes à étudier pour élucider les mécanismes de régulation.

Les études sur les bovins "Culards" présentant des mutations du gène de la myostatine ont montré que le développement musculaire variait en fonction du muscle étudié [92-94]. Chez les individus de génotype hyper-développé les muscles ne présentaient pas tous le même degré de développement allant d'hyper- à hypo-développé. Par exemple Dumont (1980) [93] décrit, chez de jeunes taureaux charcutiers "Double-musclé", une hypertrophie du *semimembranosus* et une hypotrophie du *vastus medialis*. Ainsi dans le but d'étudier les mécanismes liés à l'hyper-développement, il est intéressant d'analyser le protéome de muscles hyper- et normo-développés au sein des génotypes homozygote Texel (TT: hyper-musclé) et homozygote Romanov (RR: musculature normale) au locus "Texel". Le but de cette étude est de déterminer les effets du QTL "Texel" sur l'expression des protéines

sarcoplasmiques de quatre muscles hyper-développés ou non chez les homozygotes Texel et de présenter les différences de composition en types de fibre de ces muscles.

### *Résumé*

Dans cette étude l'électrophorèse bidimensionnelle a été utilisée pour caractériser les effets d'un QTL (*quantitative trait locus*) d'hypertrophie musculaire sur l'expression des protéines sarcoplasmiques du muscle ovin.

Dans la race ovine "Texel Belge" le QTL d'hypertrophie musculaire est localisé dans la région chromosomique du gène de la myostatine. A l'aide de marqueurs microsatellites flanquants deux génotypes ont été sélectionnés pour la comparaison: un génotype homozygote pour l'allèle "Texel" (TT) et présentant une hypertrophie musculaire et un génotype opposé homozygote pour l'allèle "Romanov" (RR) ne présentant pas d'hypertrophie. Nous avons étudié quatre muscles, trois sont hyper-développés chez les individus TT par rapport au RR le *Semimembranosus* (SM), le *Longissimus dorsi* (LD) et le *Tensor fasciae latae* (TL) et un ne l'est pas le *Vastus medialis* (VM).

Les muscles hyper-développés (LD, SM, TL) présentent une augmentation, associée au génotype TT, de l'expression des enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique. Cette augmentation des enzymes entraîne une augmentation de l'activité métabolique génératrice de stress cellulaire, induisant l'expression de chaperonnes (GST-Pi, HSP-60), de protéines régulatrices et stabilisatrices (HSC-70, HSP-27). Nous notons également une augmentation de l'expression de la transferrine (Tf), transporteur du fer et facteur myogénique [95-97]. L' $\alpha$ 1-antitrypsine (A1AT), un inhibiteur des sérine-protéases et un inhibiteur de l'action de la transferrine [96], est la seule protéine dont l'expression est toujours sous-exprimée dans le génotype TT quelque soit le muscle étudié. De plus la sous-expression de A1AT dans le muscle des individus TT et la surexpression de la Tf pourrait renforcer le signal prolifératif de la Tf, A1AT ne jouant plus son rôle d'inhibiteur compétitif de la Tf sur le récepteur à la Tf.

# Texel muscle proteome

## Proteomic analysis of ovine muscle hypertrophy<sup>1</sup>

M. Hamelin\*, T. Sayd\*, C. Chambon†, J. Bouix‡, B. Bibé‡, D. Milenkovic§, H. Leveziel§, M. Georges||, A. Clop||, P. Marinova# and E. Laville\*<sup>2</sup>

\*Unité Qualité des Produits Animaux, INRA, 63122 St-Genès-Champanelle, France

†Plateforme protéomique, INRA, 63122 St-Genès-Champanelle, France

‡Station d'Amélioration Génétique des Animaux, INRA, 31326 Castanet-Tolosan, France

§Unité de Génétique Moléculaire Animale, INRA-Université de Limoges, 87060 Limoges, France

||Département de Génétique, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, 4000 Liège, Belgium

#Institute of Animal Science, 2232 Kostinbrod, Bulgaria

<sup>1</sup>Acknowledgements: This project was supported by grants from the French Research Agency: GENANIMAL and from APIS-GENE. Muriel Hamelin benefited from fellowship of the Région Auvergne and INRA.

<sup>2</sup>Corresponding author: e-mail [elaville@clermont.inra.fr](mailto:elaville@clermont.inra.fr)

Fax: +33 (0)4 73 62 42 68

### ABSTRACT

2-D electrophoresis was used to investigate the effects of a quantitative trait locus for muscle hypertrophy on sarcoplasmic protein expression in ovine muscles. In the Belgian Texel breed, the QTL for muscle hypertrophy is localized in the chromosomal region of the myostatin-encoding gene. Based on microsatellite markers flanking the myostatin gene, we compared the hypertrophied genotype with the normal genotype. The average age of animals was three months. Among the four muscles studied, in hypertrophied genotype only the *vastus medialis* was normal, whereas the others - *semimembranosus*, *tensor fasciae latae* and *longissimus dorsi* - were hypertrophied. In the hypertrophied genotype, these muscles showed up-regulation of enzymes involved in glycolytic metabolisms together with oxidative metabolism in *longissimus dorsi* muscle. Certain chaperone proteins including glutathione S-transferase-Pi, heat shock protein-27, and heat shock cognate-70 were also more highly expressed, probably due to increased use of energetic pathways. Expression of the iron transport protein transferrin was increased. Alpha-1-antitrypsin was the only protein showing a similar pattern of expression (i.e. less expressed) in all four muscles of the hypertrophied genotype. It is suggested that transferrin and alpha-1-antitrypsin may interact to reinforce myogenic proliferative signalling.

Keywords:  $\alpha$ 1-antitrypsin, Myostatin, Sheep, Skeletal muscle, Sarcoplasmic proteins, Transferrin, Two-dimensional electrophoresis

### Introduction

Belgian strains of Texel sheep present a QTL on chromosome 2 that has a considerable effect on muscle development. The phenotype of "Texel QTL" is characterised in 3-month-old lambs corresponding to the slaughter stage. No information related to muscle hypertrophy in earlier stages of development is available. The QTL is characterised by improved carcass conformation, increased muscle weight and thickness, decreased fat content, a tendency towards increased fast-twitch myosin composition and muscle hyperplasia (Laville et al., 2004; Hamelin et al., 2005). The double-musled trait of the strain

thus has important economic interest, especially as it does not seem to be associated with sensory degradation of meat qualities. The QTL is localized in the chromosomal region of the myostatin-encoding gene (Marcq et al., 2002) which was an obvious candidate to explain hypertrophy. Myostatin loss-of-function mutations cause double-muscling in mice, cattle and humans (Lee and McPheron, 1999; Tobin and Celeste, 2005). However, sequencing of the coding region of the gene did not show polymorphism in hypertrophied lambs. Therefore further studies were engaged to find an alternative candidate gene. One of the actions engaged for that purpose was to study protein differential expression in hypertrophied muscles. Proteins, which are the main constituents of the muscle cell, also determine its structural and functional characteristics and to a certain extent the sensorial quality of meat. Two-dimensional electrophoresis (2-DE) is of a great interest since it allows the simultaneous separation of hundreds or even thousands of proteins. To date, the use of 2D-electrophoresis to study sarcoplasmic proteins, which constitute only 30% of total proteins in muscle cells, is relatively underdeveloped. However, the sarcoplasmic fraction which contains the majority of metabolism proteins and signal transduction pathways is of great interest in understanding the regulatory mechanisms involved. Studies in double-muscled cattle have shown that degree of hypertrophy varies according to the muscle (Dumont, 1980; Méniéssier, 1980). In hypertrophied genotypes, muscles can range from hypertrophied to hypotrophied. For example, in double-muscled Charolais young bulls, Dumont (1980) described hypertrophy of *semimembranosus* muscle and hypotrophy of *vastus medialis* muscle. Thus, to investigate the mechanisms of hypertrophy, it is useful to analyse protein expression of muscles presenting different ratios of hypertrophy via an experimental design comparing hypertrophied and normal genotypes. The present study aimed to determine the effect of the Belgian Texel QTL on sarcoplasmic protein expression in four Texel genotype hypertrophied or non-hypertrophied muscles presenting different fibre type composition. The study was performed on three-month-old lambs to match the slaughter age of the strain in which double muscled status was previously evaluated (Laville et al., 2005).

## Materials & Methods

### *Animals and muscle samples*

To focus the study on a QTL effect independent of polygenic Texel or Romanov background, we used crossbred lambs originating from an F2 crossing between Romanov ewes and double-muscled Belgian Texel rams. Animals were genotyped using two microsatellite markers flanking the myostatin gene to distinguish whether the locus originated from the Texel ram or Romanov ewe (Laville et al. 2004). Fifteen homozygous Texel (TT) and 17 homozygous Romanov (RR) lambs were slaughtered at a fixed weight of 33 kg for females and 39 kg for males to match commercial weight. After slaughter, carcasses were dressed according to commercial practices. Thirty minutes after slaughter, the *longissimus dorsi* (LD), *vastus medialis* (VM), *semimembranosus* (SM) and *tensor fasciae latae* (TL) muscles were resected, weighed and sampled in the middle part. The VM, SM and TL muscles are localized in the proximal segment of the hind legs. These muscles were chosen according to contractile and metabolic type and according to degree of development in the hypertrophied genotype. A previous study (Hamelin et al., 2005), reported that SM, TL and LD were heavier in TT genotype and that the VM muscle presented normal weight. LD and SM muscles are conventionally classified as fast-twitch red, while TL is fast-twitch white muscle and VM is slow-twitch red muscle. To confirm these traits, muscles were weighed and typed by histochemical method. Samples dedicated to electrophoresis were frozen in liquid nitrogen and then reduced to a fine powder under liquid nitrogen using a mortar and a mechanical pestle and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until protein extraction was performed. Samples dedicated to fibre typing were frozen in isopentane cooled with liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. 2-DE was performed on 5 TT and 5 RR lambs with 3 males and 2 females in each group randomly selected from the 15 TT and 17 RR lambs.

### ***Fibre typing***

Transverse cryosections (10  $\mu\text{m}$ ) were prepared according to Sayd et al. (1998). One section was stained using the myosin ATPase method following pre-incubation at pH 4.45 to define three fibre types: I, IIA and IIB (Brooke and Kaiser, 1970). The next section was stained for succinate dehydrogenase activity (Nachals et al., 1957) in order to split the IIB type into two groups, i.e. more oxidative IIB (IIBo) and less oxidative IIB (IIBno). Typing was realised on an average of 300 fibres per muscle.

### ***Sarcoplasmic protein extraction***

2-DE gels were performed on 5 TT and 5 RR SM, LD, TL muscles and 4 TT and 4 RR VM muscles. Gels were produced in triplicate. The sarcoplasmic fraction was obtained using a subcellular fractionation method adapted from Pietrzak et al. (1997). The extraction buffer consisted of 50 mM KCl, 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM Tris, 2 mM EDTA, 1% (w/v) DTT and 5 mM Pefabloc at pH7. Muscle samples (150 mg) were added to 1.5 mL of extraction buffer in an Eppendorf tube containing a glass bead. Homogenization was performed in a Retsch MM2 ball mill (Retsch, Haan, Germany) for 1 h at 4°C. Extracts were centrifuged at 10,000 g for 15 min at 6°C and the supernatant was collected. Samples were frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$ .

### ***Two-dimensional electrophoresis***

Immobilised pH gradient (IPG) isoelectric focusing (IEF) was carried out in a Protean IEF cell (Bio-Rad; Hercules, CA, USA), using Bio-Rad ReadyStrip, 17 cm, pH5–8. Proteins were loaded onto the strips for analytical (110  $\mu\text{g}$ ) or preparative gels (300  $\mu\text{g}$ ). Proteins were loaded by inclusion of an adequate volume of extract in a buffer consisting of 7 M urea, 2 M thiourea, 2% (w/v) CHAPS, 5 mM Pefabloc, 0.2% (w/v) DTT and 0.2% carrier ampholytes. The strips were rehydrated overnight. For the subsequent IEF, voltage was increased gradually to 8,000 V until a total of 80,000 Vh. The strips were immediately frozen and stored at  $-20^\circ\text{C}$  until further use. Before sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel Electrophoresis (SDS–PAGE), the strips were equilibrated for 15 min followed by a further 20 min in a solution of 6 M urea, 30% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS and 50 mM Tris successively supplemented with 1% (w/v) DTT or 2.5% (w/v) iodoacetamide and bromophenol blue as a dye. SDS–PAGE was performed in a protean IIXi cell (Bio-Rad) on 12% polyacrylamide gels at 15 mA per gel until the dye track reached the end of the gels. Both analytical and preparative gels were silver-stained according to the protocol described by Yan et al. (2000).

### ***Image analysis***

Gel images were acquired through a GS-800 imaging densitometer and analysed using PDQuest software (Bio-Rad). After automated detection and matching, highly saturated or ill-defined spots were manually removed. Across-gel matching of retained spots was inspected and corrected when necessary. Spots were normalized by expressing the relative quantity of each spot as the ratio of individual spot quantity to the total number of spots retained. Relative quantities were expressed in ppm (part per million). For one sample and one spot, the mean of the three values (corresponding to the gels in triplicate) was calculated.

### ***Identification of spots of interest by MALDI-ToF mass spectrometry***

Spots were excised from the gels using pipette tips. Gel pieces were placed into a 1.5 mL Eppendorf tube and destained for 2 min with a solution containing 30 mM KFe and 100 mM sodium thiosulphate, and the gel pieces were washed three times in milliQ Water for 10 min. The spots were then washed twice for 30 min with 100  $\mu\text{L}$  of 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ /5% acetonitrile for 30 min, followed by 100  $\mu\text{L}$  of 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ /acetonitrile (v/v) and dehydrated in acetonitrile. Gels spots were completely dried using a speed vac before trypsin digestion. The dried gel volume was evaluated and three volumes of trypsin (V5111, Promega, Madison, WI, USA) 10 ng/ $\mu\text{L}$  in 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  were added. Digestion was performed at  $37^\circ\text{C}$  over 5 hours. The gel pieces were precipitated by centrifugation, the supernatant was discarded, and 8 to 12  $\mu\text{L}$  of acetonitrile (depending on gel volume) were added to extract the peptides. The mixture was sonicated for 5 min and then centrifuged. For MALDI-TOF MS analysis, 1  $\mu\text{L}$  of supernatant was loaded directly onto the MALDI target. The matrix solution (5 mg. $\text{mL}^{-1}$   $\alpha$ -cyano-4-

hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile/0.1% trifluoroacetic acid) was immediately added and allowed to dry at room temperature. Peptide masses were determined in positive-ion reflector mode in a Voyager DE-Pro model MALDI-TOF mass spectrometer (PerSeptive BioSystems, Farmingham, MA, USA). External calibration was performed with a standard peptide solution (Proteomix, LaserBio Labs, Sophia-Antipolis, France). Internal calibration was performed using peptides resulting from auto-digestion of porcine trypsin with protonated masses of 842.509, 1045.564 and 2211.104. Peptides mass fingerprints were compared to mammalian databases (NCBI and SWISS-PROT) using MASCOT and ProFound software (<http://www.matrixscience.com> and <http://prowl.rockefeller.edu>, respectively). The search criteria used were one missing trypsin cleavage site, partial methionine oxidation, partial carbamidomethylation of cysteine and mass deviation lower than 30 ppm. We required at least 5 matched peptides per protein for identification and used the ProFound and MASCOT probabilistic score and the accuracy of the experimental-to-theoretical isoelectric point (pI) and molecular weight (Mw).

### **Statistics**

Statistical analysis was performed using SAS software (SAS Inst., Inc; Cary, NC). The GLM procedure was applied to test the differences between mean muscle weight values of the two genotypes (TT and RR). The model used was:  $X_{lmn} = \mu + s_{x_m} + h_l + b_m \times CW_{lmn} + E_{lmn}$ ; where  $X$  = performance of the  $n$ th individual of  $l$ th QTL haplotype and of  $m$ th sex, with  $\mu$  = general mean;  $h_l$  = fixed effect of  $l$ th QTL genotype, with  $l$  varying from 1 to 2;  $s_{x_m}$  = fixed effect of  $m$ th sex, with  $m$  varying from 1 to 2;  $b_m$  = regression coefficient of carcass weight on character for individual  $m$ th sex;  $CW_{lmn}$  = carcass weight of the  $n$ th individual, of  $l$ th QTL haplotype and of  $m$ th sex; and  $E_{lmn}$  = random residual value  $\sim N(0, \sigma^2_E)$ .

ANOVA was used to test for significance ( $P < 0.05$ ) of the statistical fixed effect of muscle on fibre type percentage. Where significant effects were found, Student's t-tests were used to identify differences between pairs of muscles at the 5% significance level.

Concerning 2D-electrophoresis, the resulting set of averaged spot quantities was submitted independently for each muscle to the one-way ANOVA. An ANOVA at  $p < 0.05$  indicated that the spot was significant.

## **Results**

### **Muscle weight**

Means and genetic effects on muscle weights are presented in table 1. Weights of SM, TL and LD were higher in TT genotype than in RR muscles. There was no between-genotype difference in weight of VM muscle.

### **Fibre typing**

The muscle effect on fibre type percentage is presented in table 2. Compared with VM, the TL, SM and LD muscles were predominantly fast-twitch (IIB). Among this group, the TL presented the highest rate of fast-twitch white fibres (IIB). The LD muscle was characterised by a higher rate of red fast-twitch IIA fibres whereas the SM had a higher rate of slow-twitch red fibres (I). The VM presented higher rate of slow-twitch red fibres and a predominantly oxidative metabolism (I, IIBo).

### **2-DE and mass spectrometry**

Using MALDI-TOF mass spectrometry, we identified 63 spots expressed differentially between genotypes. Differential protein expression between genotypes is presented independently for each muscle because protein redundancy was low (tables 3, 4 5 and 6, figure 1). Many of the common proteins evidenced in the different muscles corresponded to different isoforms (see spot labels in the tables).

*Longissimus dorsi*: We identified 22 differentially expressed spots in the LD. Ten were associated with glycolytic metabolism and matched to five different proteins: enolase, phosphoglucotases (3 spots), glycerol-3-phosphate dehydrogenases (2 spots), pyruvate kinase 3 and triosephosphate isomerases (3 spots). Excluding one of the triosephosphate isomerase isoforms, all these proteins showed higher

expression in the TT genotype. They included two that were related to Krebs' cycle and oxidative phosphorylation in mitochondria: i.e. three spots of succinate dehydrogenase and the NADH dehydrogenase whose role is to allow NAD<sup>+</sup> cofactors to regenerate. Also showing higher expression in the TT were the alpha type 1 and beta type 7 proteasome subunits and the constitutive chaperone protein heat shock cognate 70 involved in myosin head stabilization. Expression of the iron transporter transferrin was also higher in the TT genotype. Three fragments of ovine pre-pro serum albumin and the alpha-1-antitrypsin a serine protease inhibitor were less expressed in the TT genotype.

*Semimembranosus*: We identified 22 differentially expressed spots in the SM. Similarly to the LD muscle, expression of proteins associated with glycolytic metabolism was higher in the TT genotype: enolase (4 spots including a fragment), pyruvate kinase (4 spots including 2 fragments), lactate dehydrogenase B, 3 fragments of glycogen myophosphorylase and 6 spots including 5 fragments matching to creatine kinase. Two spots more highly expressed in the TT genotype were chaperone proteins: the small heat shock protein 27kDa and the glutathione S-transferase Pi. Similarly to the LD muscle, alpha-1-antitrypsin was less expressed and the iron transporter transferrin was more expressed in TT genotype.

*Tensor fasciae latae*: We identified 11 differentially expressed spots in the TL. Amongst them, 5 were proteins associated with glycolytic metabolism, 4 were more expressed in the TT genotype: fructose-1,6-biphosphatase 2, glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1, enolase and creatine kinase. Biphosphoglycerate mutase was less expressed in the TT genotype. Expression of actin alpha 1, which is the monomeric form of actin polymer filament, was also higher in the TT genotype. We found two fragments of pre-pro serum albumin, one more expressed and one less expressed in the TT genotype. We identified 4 proteins that were less expressed in the TT genotype. Two were related to mitochondria and oxidative metabolism: the ATP synthase F1 beta subunit and the heat shock protein 60kDa. Alpha-1-antitrypsin was less expressed in the TT genotype.

*Vastus medialis*: We identified 8 differentially expressed spots in the VM. Four were involved in glycolytic metabolism: the glycogen myophosphorylase (fragment), the triosephosphate isomerase (fragment), and the phosphoglycerate kinase, which were less expressed in the TT genotype, and a fragment of lactate dehydrogenase-A which was more expressed in the TT genotype. An immunoglobulin heavy-chain C region was also more expressed in the TT. We identified 2 chaperone proteins, i.e. glutathione S-transferase-Pi which was less expressed in TT and Antiquitin 1 which was more expressed in TT. Similarly to the other three muscles, expression of alpha-1-antitrypsin was lower in TT.

## Discussion

### *Post-translational modifications and Protein fragments*

A same protein can be found in different spots at different pI and Mw locations within a muscle and/or between different muscles. The different pI and Mw locations of a same protein on gel maps could correspond to different isoforms. Isoform expression can result from the expression of different genes and/or be triggered by post-translational modifications such as oxidation, glycosylation, phosphorylation or proteolytic cleavage. One isoform may be more expressed in one muscle whereas for another muscle it may be another isoform. We observed that isoforms differentially expressed between genotypes showed similar patterns of between-muscle expression, as was the case with the enolase proteins. This phenomenon is probably related to functional abilities of muscles for which one isoform may be predominant. Different protein isoforms present different functional properties. For example, it was found that troponin T isoforms may be related to either slow- or fast-twitch fibre types (Bouley et al., 2005).

Based on an apparent Mw lower than the theoretical Mw, some of the spots identified were protein fragments (table 3, 4,5 and 6). Most of these were over-represented in the SM of TT. Many fragments were derived from glycolytic proteins (pyruvate kinase, glycogen myophosphorylase). Due to its high Mw and basic pI, the whole protein of glycogen myophosphorylase could not be visualized on our 2-D gels, and thus only fragments were evidenced. Previous studies using 2D-electrophoresis have also

observed protein fragments in muscles sampled very early after slaughter (Lametsch et al., 2002; Morzel et al., 2004). The authors explained the presence of fragments as being due to early proteolysis after slaughter as well as probable *intra vitam* proteolysis. It is possible that the higher abundance of fragments may be a consequence of increased oxidation levels. Niikawa et al. (2002) have shown that proteolysis can be induced *intra vitam* by exercise, and that the concomitant increased use of the respiratory chain is a natural source of reactive oxygen species production and consequently, oxidative stress. Some sarcoplasmic proteins such as enolase and creatine kinase are particularly prone to oxidation, as described in oxidative stress-induced diseases (Castegna et al., 2002a,b). However, fragments were not identified in all muscles (i.e. only in the SM and VM) and did not appear to be related to a particular genotype or degree of hypertrophy. Given that a majority of intact glycolytic enzymes were found to be over-represented in the TT genotype, we may also hypothesize that the over-representation of glycolytic enzyme fragments reflects an increased initial levels of entire protein.

### ***Energetic metabolism and related proteins***

Most of the proteins differentially expressed between genotypes were involved in energetic metabolism. An increase in enzyme concentration will lead to an acceleration of the production of energetic molecules. Different metabolic pathways were involved..

Creatine kinase, which is an enzyme essential to a rapid replenishment of cellular ATP stocks, was more highly expressed in the SM and TL muscles of TT animals; Okumura et al. (2005) found it more highly expressed in glycolytic muscles, where it ensures fast energy refill.

Most of the proteins identified as more highly expressed in TT than RR genotype were enzymes involved in carbohydrate degradation. They included triosephosphate isomerase, glycerol-3-phosphate dehydrogenase and biphosphoglycerate mutase which are all involved in shifts in the main pathway of glycolysis. Thus, the lower triosephosphate isomerase and biphosphoglycerate mutase expression in LD and TL muscles of TT animals can be interpreted as over-activation of the main pathway of glycolysis. The reverse activity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase means that its higher expression in TT animals remained unexplained, but is possibly evidence of increased mobilisation of triglycerides.

The lower abundance of phosphoglycerate kinase in the VM muscle of TT suggests that an enhanced glycolytic pathway is related to muscle development but not to gene polymorphism. The higher abundance of enzymes involved in glycolytic metabolism in hypertrophied muscles was in accordance with a previous study showing a higher level of the myosin heavy-chain fast isoform in muscles of the TT genotype (Laville et al., 2004), and another study on the muscle proteome of a myostatin deletion in cattle (Bouley et al., 2005). Working on total protein extract, the authors mainly observed modifications in contractile apparatus towards a fast-twitch potential. This result was supported by an up-regulation of the glycolytic enzyme phosphoglucomutase. Our subcellular compartment fractionation method enabled us to evidence more proteins involved in metabolism and signalling, which are masked by myofibrillar proteins in total extract analysis.

The switch in hypertrophied muscle metabolism towards a more glycolytic pattern can be related to the lower level of capillary supply previously observed in the TL and SM muscle of TT genotype animals (Hamelin et al., 2005). This hypothesis is consistent with the effects of chronic hypoxia described by Lopez-Barneo et al. (2001) because hypoxia up-regulates glucose degradation.

Four mitochondrial proteins were evidenced that are involved in the respiratory chain and oxidative phosphorylation. Heat shock protein 60kDa is a chaperone protein produced in precursor form in cytoplasm and then translocated into mitochondria. It stabilizes proteins and facilitates folding and protein assembly in the mitochondrial matrix (Liu and Steinacker, 2001). Its expression is increased in skeletal muscle after prolonged endurance training, due to increased metabolic demand associated with oxidative fibre type (Liu and Steinacker, 2001). ATP synthase F1 beta subunit (F1-ATPase  $\beta$ ) is the catalytic part of the ATP synthase complex in the mitochondria. F1-ATPase  $\beta$  catalyses ATP synthesis starting from ADP+Pi and using the proton gradient as energy source. The lower expression of both heat shock protein 60kDa and F1-ATPase  $\beta$  proteins in TL muscle of the TT genotype is consistent with the more glycolytic profile of this hypertrophied muscle. NADH dehydrogenase and succinate dehydrogenase were more highly expressed in the LD muscle of TT. The hypertrophied LD muscle presented a peculiar feature in that proteins associated with both oxidative and glycolytic metabolism were up-regulated. In comparison with SM and TL muscles, LD presented a more oxidative metabolism

(table 1). LD muscle is richer in type IIA fibres, which in normal sheep present more oxidative metabolism than type I fiber (Suzuki, 1971; Briand et al. 1981; Sayd et al., 1998). This would lead to the conclusion that muscle hypertrophy enhances the predominant metabolism in that muscle. If the muscle combines oxidative and glycolytic metabolisms, both would be enhanced. Because this feature has not previously been described, it would be useful to study enzyme expression in a hypertrophied muscle with a more oxidative profile, such as the *supraspinatus*.

### ***Proteins associated with contractile apparatus***

Heat shock protein-27 (HSP-27) and heat shock cognate-70 (HSC-70) are chaperone proteins that promote cell survival during physiological stress (Thompson et al., 2003). HSP-27 has been reported to play a central role in the structural and functional organisation of the three-dimensional intermediate filament structure and the actin microfilament system (Fischer et al., 2002) and may also act as a molecular chaperone. HSP-27 exists in many isoforms (Scheler et al., 1999). Kim et al. (2004) reported that one isoform is more highly expressed in glycolytic muscle. This is in agreement with the results presented here, where the increased glycolytic metabolism in SM muscles of TT genotype was associated with upregulation of HSP-27. HSC-70 was more highly expressed in the LD muscle of the TT genotype. It is involved in folding and assembly of myosin in striated muscle (Srikakulam and Winkelmann, 2004) and facilitates the proper folding of labile proteins, protects proteins from unfolding during stress, and prevents aggregation of already unfolded proteins (Welch, 1992). Actin alpha 1 corresponds to the monomeric form of actin filaments. Before polymerisation, these monomers remain free in the cell cytoplasm. All three proteins Actin alpha 1, HSP-27 and HSC-70 are associated with the contractile apparatus. Their overexpression in hypertrophied muscles may indicate an increased need for material to promote myofibril assembly. This need may simply be due to the hypertrophic status of the muscles of three-month-old lambs still in growing phase. In addition, an enhanced metabolism as observed in hypertrophied muscles is known to produce cytotoxic compounds such as methylglyoxal (see Thornalley, 1996 for review) as well as cytoplasm acidification (lactate production) which can damage both proteins and cell structures such as myofibrillar filaments. Consequently, these muscles present higher protein turnover, as indicated by the upregulation.

### ***Detoxification***

Glutathione S-transferase Pi (GST-Pi), which was more expressed in the TT genotype in the most hypertrophied muscle (SM) but less expressed in the less hypertrophied muscle (VM), plays a role in mechanisms of cellular detoxification and cellular resistance to oxidative damage (Lo Bello et al., 2001) by catalyzing the conjugation of glutathione to potentially toxic compounds such as reactive oxygen species. Gelfi et al. (2004) reported that GST-Pi was highly expressed in muscles of Tibetan people living at high altitude where blood oxygenation is more difficult.

The proteasome is involved in degradation of altered proteins. The higher relative abundance of two subunits of proteasome in the LD muscle of TT genotype would indicate an increase in altered proteins needing to be degraded. As suggested above, enhanced muscle metabolism produces a range of cytotoxic compounds (Bloomer and Goldfarb, 2004), and therefore the higher abundance of proteasome subunits and GST-Pi is consistent with the higher metabolism observed in hypertrophied TT muscles.

### ***Regulators***

Transferrin (Tf) is a protein that is normally synthesised in the liver. It binds iron and delivers it to cells. Lopez-Barneo et al., in a study on the effects of chronic hypoxia (2001) reported that hypoxia induces in skeletal muscle an up-regulated expression of glucose degradation enzymes and transporters, including Tf. In our study, the SM and LD muscles of TT genotype showed higher glycolytic enzyme expression in association with a less developed vasculature of the SM muscle (Hamelin et al., 2005). The more highly expressed Tf could therefore be interpreted as a mechanism to compensate the hypoxia generated by decreased blood supply or increased metabolic demand. Furthermore, Tf has also been identified in different species as a myotrophic factor stimulating the proliferation of myoblasts and satellite cells in culture (Ozawa, 1989; Graziadei, 1998). Moreover, Tf levels are highest when the proliferative demands of foetal tissues are at a peak, indicating a mitogenic effect of Tf independently of its ability to supply

iron to proliferating tissues (Meek and Adamson, 1985). Alpha-1-antitrypsin (A1AT) expression was lower in all 4 muscles of TT genotype studied. A1AT is a member of the serine protease inhibitor protein family (serpins) whose main target is the elastase (Travis and Salvesen, 1983). It can also inhibit muscle cysteine proteinases such as cathepsin K, L and S (Gettins, 2002). Graziadei et al. (1998) provided evidence of another function for A1AT: because it has a strong affinity for the Tf membrane receptor, A1AT may compete directly with Tf for the receptor site and consequently inhibit erythroid and fibroblast proliferation by interfering with Tf-mediated iron uptake. To our knowledge, there have been no reports of such an effect on myoblasts or muscle cells. However, the combined effects of higher abundance of Tf in SM and LD muscles of TT genotype and lower abundance of A1AT could interact to reinforce proliferative signalling. This hypothesis is supported by the hyperplastic status of Texel hypertrophy (Hamelin et al., 2005) and the known effects of Tf on muscle development.

### ***Others***

Some proteins, such as the immunoglobulin heavy-chain C region and pre-pro serum albumin fragments, appear to be irrelevant in skeletal muscle. Immunoglobulins are usually present in the extracellular medium and on the membrane surface, and the over-expression in VM of TT genotype of a single immunoglobulin region is difficult to interpret in terms of muscular function.

This study investigated the effect of the 'Texel' QTL on the expression of sarcoplasmic proteins in four different muscles. A1AT was the only protein identified to show a similar pattern of expression between TT and RR genotypes in the four muscles studied, independently of hypertrophic or muscle fibre type status. Because of its affinity to the Tf membrane receptor, the decrease in A1AT expression could interact with upregulated Tf expression to reinforce the Tf proliferative signal. Recently, Clop et al. (2006) have shown that the double-muscled Belgian Texel strain is a myostatin mutant. These authors described a mutation in the 3'UTR region of the myostatin gene creating a microRNA target leading to microRNA-mediated translational downregulation in the myostatin concentration contributing to muscular hypertrophy. The hypertrophic model of Texel muscle is thus probably a hyperplastic phenomenon that occurred in the foetal stage of development. Myostatin regulates muscle development by a very complex mechanism that remains only partially understood. Many myogenic factors are involved, including the Tf effect, whose interaction with A1AT should therefore be considered. In this perspective, further studies should be conducted to investigate the expression of these proteins or their corresponding genes at the foetal stage of proliferation when myostatin exerts its main effects. These studies should be associated to measures of the expression of myostatin and microRNA. Certain muscles as *vastus medialis* do not express the hypertrophic phenotype, suggesting more complex mechanisms of regulation.

## Literature cited

- Bloomer, R. J. and A. H. Goldfarb. 2004. Anaerobic exercise and oxidative stress: a review. *Can. J. Appl. Physiol.* 29:245-63.
- Bouley, J., B. Meunier, C. Chambon, S. De Smet, J. F. Hocquette, and B. Picard. 2005. Proteomic analysis of bovine skeletal muscle hypertrophy. *Proteomics* 5:490-500.
- Briand, M., A. Talmant, Y. Briand, G. Monin, and R. Durand. 1981. Metabolic types of muscle in the sheep: I. Myosin ATPase, glycolytic, and mitochondrial enzyme activities. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 46:347-58.
- Brooke, M.H., K. K. Kaiser. 1970. Three 'myosin adenosine triphosphatase' systems: the nature of their lability and sulfhydryl dependence. *J. Histochem. Cytochem.* 18:670-2.
- Castegna, A., M. Aksenov, M. Aksenova, V. Thongboonkerd, J. B. Klein, W. M. Pierce, R. Booze, W. R. Markesbery, and D. A. Butterfield. 2002a. Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part I: creatine kinase BB, glutamine synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1. *Free Radic. Biol. Med.* 33:562-71.
- Castegna, A., M. Aksenov, V. Thongboonkerd, J. B. Klein, W. M. Pierce, R. Booze, W. R. Markesbery, and D. A. Butterfield. 2002b. Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part II: dihydropyrimidinase-related protein 2, alpha-enolase and heat shock cognate 71. *J Neurochem.* 82:1524-32.
- Clop, A., F. Marcq, H. Hakeda, D. Pirottin, J. Tobin, B. Bibé, J. Bouix, F. Caiment, J.M. Elsen, F. Eychenne, C. Larzul, E. Laville, F. Meish, D. Milenkovic, X. Tordoir, C. Charlier, and M. Georges. A mutation revealing an illegitimate miRNA target site in the myostatin gene is a QTN with major effect on muscularity in Texel sheep. *Nature Genetics.* (on line).
- Dumont, B. L. Carcass composition and muscle hypertrophied animals. 1980. Page 111 in 16<sup>th</sup> ed. *Muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef production.* King J.W.B. and Ménessier F. Ed. M. Nijhoff, The Hague, The Netherlands.
- Fischer, D., J. Matten, J. Reimann, C. Bonnemann, and R. Schroder. 2002. Expression, localization and functional divergence of alphaB-crystallin and heat shock protein 27 in core myopathies and neurogenic atrophy. *Acta Neuropathol. (Berl)* 104:297-304.
- Gelfi, C., S. De Palma, M. Ripamonti, I. Eberini, R. Wait, A. Bajracharya, C. Marconi, A. Schneider, H. Hoppeler, and P. Cerretelli. 2004. New aspects of altitude adaptation in Tibetans: a proteomic approach. *FASEB J.* 18:612-4.
- Gettins, P. G. 2002. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem. Rev.* 102:4751-804.
- Graziadei I. 1998. The acute-phase protein alpha1-antitrypsin inhibits transferrin-receptor binding and proliferation of human skin fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 1401:170-176.
- Hamelin, M., C. Chambon, T. Sayd, J. Bouix, B. Bibé, A. Clop, M. Georges, D. Milenkovic, H. Levéziel, P. Marinova, and E. Laville. 2005. Ovine double-muscling: muscle structure & protein pattern. 51st Int. Cong. Meat Sci. Technol. Baltimore, USA.
- Kim, N. K., J. H. Joh, H. R. Park, O. H. Kim, B. Y. Park, and C. S. Lee. 2004. Differential expression profiling of the proteomes and their mRNAs in porcine white and red skeletal muscles. *Proteomics* 4:3422-8.
- Lametsch, R., P. Roepstorff, and E. Bendixen. 2002. Identification of Protein Degradation during Post-mortem Storage of Pig Meat. *J. Agric. Food Chem.* 50:5508-12.
- Laville, E., J. Bouix, T. Sayd, B. Bibe, J. M. Elsen, C. Larzul, F. Eychenne, F. Marcq, and M. Georges. 2004. Effects of a quantitative trait locus for muscle hypertrophy from Belgian Texel sheep on carcass conformation and muscularity. *J. Anim. Sci.* 82:3128-37.
- Lee, S. J. and McPheron, A. C. 1999. Myostatin and the control of skeletal muscle mass. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9: 604-607.
- Liu, Y. and J. M. Steinacker. 2001. Changes in skeletal muscle heat shock proteins: pathological significance. *Front Biosci.* 6:D12-25.
- Lo Bello, M., M. Nuccetelli, A. M. Caccuri, L. Stella, M. W. Parker, J. Rossjohn, W. J. McKinstry, A. F. Mozzi, G. Federici, F. Polizio, J. Z. Pedersen, and G. Ricci. 2001. Human glutathione transferase P1-1 and nitric oxide carriers; a new role for an old enzyme. *J. Biol. Chem.* 276:42138-45.
- Lopez-Barneo, J., R. Pardal, and P. Ortega-Saenz. 2001. Cellular mechanism of oxygen sensing. *Annu. Rev. Physiol.* 63:259-87.
- Marcq, F., C. Larzul, V. Marot, J. Bouix, F. Eychenne, E. Laville, B. Bibé, P. Leroy, M. Georges, and J.M. Elsen. 2002. Preliminary results of a whole-genome scan targeting QTL for carcass traits in Texel×Romanov intercross. Pages 323-326 in *Proc. 7th World Cong. On Genetic Appl. Livest. Montpellier, France.*

- Meek, J. and E. D. Adamson. 1985. Transferrin in foetal and adult mouse tissues: synthesis, storage and secretion. *JO Embryol. Exp. Morphol.* 86:205-18.
- Ménissier, F. General survey of the effect of double muscling on cattle performance. 1980. Page 23 in 16<sup>th</sup> ed. *Muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef production.* King J.W.B. and Ménissier F. Ed. M. Nijhoff, The Hague, The Netherlands.
- Morzel, M., C. Chambon, M. Hamelin, V. Santé-Lhoutellier, T. Sayd, and G. Monin. 2004. Proteome changes during pork meat ageing following use of two different pre-slaughter handling procedures. *Meat Sci.* 67:689-696.
- Nachals, M. M., Tsou K., DeSousa E., Chang C., Seligman A.M. 1957. Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. *J. Histochem. Cytochem.* 5:420-36.
- Nikawa, T., M. Ikemoto, T. Sakai, M. Kano, T. Kitano, T. Kawahara, S. Teshima, K. Rokutan, and K. Kishi. 2002. Effects of a soy protein diet on exercise-induced muscle protein catabolism in rats. *Nutrit.* 18:490-495.
- Okumura, N., A. Hashida-Okumura, K. Kita, M. Matsubae, T. Matsubara, T. Takao, and K. Nagai. 2005. Proteomic analysis of slow- and fast-twitch skeletal muscles. *Proteomics* 5:2896-906.
- Ozawa, E. 1989. Transferrin as a muscle trophic factor. *Rev Physiol. Biochem. Pharmacol.* 113:89-141.
- Pietrzak, M., M. L. Greaser, and A. A. Sosnicki. 1997. Effect of Rapid rigor Mortis Processes on Protein Functionality in Pectoralis Major Muscle of Domestic Turkeys. *J. Anim. Sci.* 75:2106-2116.
- Sayd, T., T. Mera, V. Martin, and E. Laville. 1998. Spatial distribution of myosin heavy chain isoforms and lactate dehydrogenase M4 in the limb musculature of two crossbred lambs. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 120:153-163.
- Scheler, C., X. P. Li, J. Salnikow, M. J. Dunn, and P. R. Jungblut. 1999. Comparison of two-dimensional electrophoresis patterns of heat shock protein Hsp27 species in normal and cardiomyopathic hearts. *Electrophoresis* 20:3623-8.
- Srikakulam, R. and D. A. Winkelmann. 2004. Chaperone-mediated folding and assembly of myosin in striated muscle. *J. Cell. Sci.* 117:641-52.
- Suzuki A. 1971. Histochemical classification of individual skeletal muscle fibres in the sheep. I. On M. semitendinosus, M. longissimus dorsi, M. psoas major, M. latissimus dorsi and M. gastrocnemius. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 42:39-47.
- Thompson, H. S., E. B. Maynard, E. R. Morales, and S. P. Scordilis. 2003. Exercise-induced HSP27, HSP70 and MAPK responses in human skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* 178:61-72.
- Thornalley, P. J. 1996. Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification--a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen. Pharmacol.* 27:565-573.
- Tobin, J. F. and Celeste, A. J. 2005. Myostatin a negative regulator of muscle mass: implication for muscle degenerative diseases. *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 328-332.
- Travis, J. and G. S. Salvesen. 1983. Human plasma proteinase inhibitors. *Annu. Rev. Biochem.* 52:655-709.
- Welch, W. J. 1992. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol. Rev.* 72:1063-81
- Yan, J. X., R. Wait, T. Berkelman, R. A. Harry, J. A. Westbrook, C. H. Wheeler, and M. J. Dunn. 2000. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis* 21:3666-72.

Table 1. Effect of Texel genotype on muscle weights

Muscle weight, g <sup>a</sup>	Mean	SD	QTL effect	
			Test <sup>b</sup>	TT - RR <sup>c</sup>
LD	490.6	54.952	***	85.93
SM	270.9	23.235	***	43.67
TL	49.7	8.127	*	9.24
VM	43.7	7.247	NS	-1.3

<sup>a</sup> LD, *longissimus dorsi*; SM, *semimembranosus*; TL, *tensor fasciae latae*; VM, *vastus medialis* (N = 15 TT and 17 RR)

<sup>b</sup> NS = P > 0.10 ; \*P < 0.05 ; \*\*\*P < 0.001

<sup>c</sup> A positive value for TT – RR corresponds to an additive increase due to the Belgian Texel QTL. T = Texel, R = Romanov.

Table 2. Effect of muscle type on fiber type percentage

Fibre type % <sup>e</sup>	Muscles <sup>f</sup>			
	LD	SM	TL	VM
I	9.5 <sup>a</sup> ±3.9	13.6 <sup>b</sup> ±4.5	7.1 <sup>c</sup> ±3.7	23.4 <sup>d</sup> ±4.7
IIa	24.5 <sup>a</sup> ±7.8	18.5 <sup>b</sup> ±7.9	18.9 <sup>b</sup> ±4.9	18.6 <sup>b</sup> ±3.4
IIb	66 <sup>a</sup> ±7.7	68.9 <sup>a</sup> ±9	74 <sup>b</sup> ±6.4	58 <sup>c</sup> ±4.4
IIbox	23.3 <sup>a</sup> ±10.5	24.8 <sup>a</sup> ±10.5	27 <sup>a</sup> ±10.4	35.4 <sup>b</sup> ±6.4
IIbno	42.7 <sup>a</sup> ±7.7	43.1 <sup>a</sup> ±13.9	47 <sup>a</sup> ±8.6	22.6 <sup>b</sup> ±3.7

<sup>abcd</sup> Means with different superscripts are significantly different at P<0.05.

<sup>e</sup> I, fibre type I; IIa, fibre type IIa; IIb, fibre type IIb; IIbox, fibre type IIb more oxidative; IIbno, fibre type IIb less oxidative. IIbox and IIbno are subdivisions of IIb

<sup>f</sup> LD, *longissimus dorsi*; SM, *semimembranosus*; TL, *tensor fasciae latae*; VM, *vastus medialis* (N= 15 TT and 17 RR)

Table 3. Proteins differentially expressed between Texel (N = 5) and Romanov (N = 5) genotypes in *Longissimus dorsi*

<i>Longissimus dorsi</i>								
Spot	Accession number <sup>a</sup>	Protein ID <sup>a</sup>	Mw (kDa) / pI theoretical <sup>b</sup>	Mw (kDa) / pI estimate <sup>b</sup>	Matched peptide <sup>c</sup>	Sequence coverage <sup>c</sup>	Relative abundance TT/RR <sup>d</sup>	
Energetic metabolism: Glycolytic								
1	gi 57086343	Enolase	47-55/ 6.4-8.4	47 / 6.6	11	23%	1.8	
2	gi 1942567	Phosphoglucomutase Chain B	61.5 / 6.62	60 / 7.1	18	34%	2.0	
3	gi 538558	Phosphoglucomutase	61.5 / 6.58	63 / 7.7	9	18%	2.3	
4	gi 31980726	Phosphoglucomutase 2	61.5 / 6.30	62 / 6.8	17	31%	2.0	
5	gi 61867146	Pyruvate kinase 3	58 / 7.2-7.9	50 / 6.3	21	33%	2.9	
6	gi 61888856	Triosephosphate isomerase	27 / 6.45	30 / 6.75	8	39%	1.6	
7	gi 59858493	Triosephosphate isomerase 1	27 / 6.45	30 / 7.2	7	33%	-2.7	
8	gi 59858493	Triosephosphate isomerase 1	27 / 6.45	30 / 7.5	14	56%	-2.7	
9	gi 59857727	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1	38 / 6.42	40 / 6.8	9	25%	3.0	
10	gi 59857727	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1	38 / 6.42	40 / 7.0	13	38%	1.9	
Energetic metabolism: Oxidative								
11	gi 1364245	NADH dehydrogenase	23.5 / 5.71	29 / 6.1	5	27%	2.3	
12	gi 284649	Succinate dehydrogenase (ubiquinone)	73 / 7.27	64 / 6.55	11	20%	1.9	
13	gi 284648	Succinate dehydrogenase (ubiquinone)	73 / 7.27	62 / 6.7	19	33%	2.1	
14	gi 284649	Succinate dehydrogenase (ubiquinone)	73 / 7.27	62 / 6.65	16	30%	1.9	
Contractile apparatus-associated protein								
15	gi 56385	Heat shock Cognate 70	71 / 5.43	70 / 5.35	22	45%	1.9	
Detoxification								
16	gi 30582133	Proteasome subunit. alpha type 1	30 / 6.51	36 / 6.8	9	39%	3.0	
17	gi 38051889	Proteasome subunit. beta type 7	30 / 8.13	34 / 6.3	12	31%	1.9	
Regulators								
18	gi 57526646	Alpha-1-anti trypsin	46 / 5.83	60 / 5.1	13	29%	-2.1	
19	gi 29135265	Transferrin	78 / 6.75	75 / 6.9	16	24%	2.7	
Others								
20	gi 57164373	pre-pro Serum Albumin, Ovine <b>fgt</b>	69 / 5.80	54 / 5.5	24	38%	-2.4	
21	gi 57164373	pre-pro Serum Albumin, Ovine <b>fgt</b>	69 / 5.80	30 / 5.5	15	22%	-2.6	
22	gi 57164373	pr-e-pro Serum Albumin, Ovine <b>fgt</b>	69 / 5.80	53 / 5.8	14	22%	-2.3	

<sup>a</sup> Protein names and Accession numbers were taken from the NCBI database

<sup>b</sup> Mw and pI, both theoretical (recorded in the NCBI database) and estimated (calculated from the spot position on the gel)

<sup>c</sup> Number of peptides that matched the protein sequence and total percentage of sequence coverage

<sup>d</sup> Relative abundance TT/RR: highest average quantity / lowest average quantity. A minus sign indicates that relative abundance of the protein is lower in the TT genotype

**Fgt**, protein fragments.

Table 4. Proteins differentially expressed between Texel (N = 5) and Romanov (N = 5) genotypes in

<i>Semimembranosus</i>							
Spot	Accession number <sup>a</sup>	Protein ID <sup>a</sup>	Mw (kDa) / pI theoretical <sup>b</sup>	Mw (kDa) / pI estimate <sup>b</sup>	Matched peptide <sup>c</sup>	Sequence coverage <sup>c</sup>	Relative abundance TT/RR <sup>d</sup>
Energetic metabolism: Glycolytic							
23	gi 27806645	Enolase 1	47 / 6.44	41.5 / 5.3	14	41%	2.5
24	gi 27806645	Enolase 1	47 / 6.44	41.5 / 5.2	15	45%	2.4
25	gi 57086343	Enolase 3	47 / 7.58	41 / 6.7	14	42%	1.9
26	gi 57086343	Enolase 3 <b>fgt</b>	47 / 7.58	27 / 5.6	7	21%	1.9
27	gi 57163939	Glycogen myophosphorylase <b>fgt</b>	97 / 6.65	35 / 6.65	8	9%	2.0
28	gi 57163939	Glycogen myophosphorylase <b>fgt</b>	97 / 6.65	35 / 7.0	13	12%	1.9
29	gi 57163939	Glycogen myophosphorylase <b>fgt</b>	97 / 6.65	35 / 6.6	12	11%	3.9
30	gi 332864188	Pyruvate kinase	58 / 7.2-7.9	50 / 6.3	20	34%	2.0
31	gi 2117873	Pyruvate Kinase	58 / 7.2-7.9	55 / 7.8	20	39%	1.9
32	gi 33286422	Pyruvate kinase <b>fgt</b>	58 / 7.2-7.9	40 / 5.9	12	23%	2.2
33	gi 31416989	Pyruvate Kinase <b>fgt</b>	58 / 7.2-7.9	40.5 / 6.0	16	31%	2.0
34	gi 59858383	Lactate dehydrogenase B	37 / 6.02	40.5 / 6.5	20	55%	2.0
35	gi 4838363	Creatine Kinase M <b>fgt</b>	43 / 6.63	29 / 6.9	13	22%	1.9
36	gi 6729828/gi 66920	Creatine Kinase Chain A/M <b>fgt</b>	43 / 6.63	33 / 7.0	11	28%	1.9
37	gi 6729828/gi 66920	Creatine Kinase Chain A/M <b>fgt</b>	43 / 6.63	33 / 6.9	8	21%	1.9
38	gi 4838363	Creatine Kinase M <b>fgt</b>	43 / 6.63	17 / 6.0	7	15%	2.8
39	gi 4838363	Creatine Kinase M <b>fgt</b>	43 / 6.63	29 / 7.3	11	23%	2.3
40	gi 4838363	Creatine Kinase M	43 / 6.63	35.5 / 7.6	16	33%	2.0
Contractile apparatus-associated protein							
41	gi 61553385	Heat Shock Protein 27kDa	23 / 6.0-6.2	29 / 6.7	9	44%	2.4
Detoxification							
42	gi 6013379	Glutathione S-transferase Pi	24 / 7.65	25 / 6.9	9	63%	2.5
Regulators							
18	gi 57526646	Alpha-1-anti-trypsin (A1AT)	46 / 5.83	60 / 5.1	13	29%	-2.0
19	gi 29135265	Transferrin	78 / 6.75	75 / 6.9	16	24%	3.6

*Semimembranosus*

<sup>a</sup> Protein names and Accession numbers were taken from the NCBI database

<sup>b</sup> Mw and pI, both theoretical (recorded in the NCBI database) and estimated (calculated from the spot position on the gel)

<sup>c</sup> Number of peptides that matched the protein sequence and total percentage of sequence coverage

<sup>d</sup> Relative abundance TT/RR: highest average quantity / lowest average quantity. A minus sign indicates that relative abundance of the protein is lower in the TT genotype

**Fgt**, protein fragments

Table 5. Proteins differentially expressed between Texel (N = 5) and Romanov (N = 5) genotypes in *Tensor fasciae latae*

<i>Tensor fasciae latae</i>							
Spot	Accession number <sup>a</sup>	Protein ID <sup>a</sup>	Mw (kDa) / pI theoretical <sup>b</sup>	Mw (kDa) / pI estimate <sup>b</sup>	Matched peptide <sup>c</sup>	Sequence coverage <sup>c</sup>	Relative abundance TT/RR <sup>d</sup>
Energetic metabolism: glycolytic							
43	gi 61839453	Bisphosphoglycerate mutase	30 / 6.0	32 / 6.6	10	41%	-1.6
44	gi 29792061	Enolase 1	47 / 6.4-7.0	49.5 / 6.25	8	18%	2.4
45	gi 2154755	Fructose-1,6-bisphosphatase 2	37 / 6.84	39 / 7.0	5	13%	1.9
10	gi 59857727	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1	38 / 6.42	40 / 7.0	13	38%	1.9
46	gi 4838363	Creatine Kinase M	43 / 6.63	45 / 7.2	8	22%	3.0
Energetic metabolism: oxidative							
47	gi 1374715	ATP synthase F1, beta subunit	51 / 4.97	52 / 5.05	13	38%	-1.9
48	gi 1334284	Heat Shock Protein 60kDa	61 / 5.71	60 / 5.15	8	27%	-2.5
Contractile apparatus-associated proteins							
49	gi 33563240	Actin, alpha 1	42 / 5.23	46 / 5.5	8	26%	2.1
Regulators							
50	gi 57526646	Alpha-1-anti trypsin	46 / 5.83	60 / 5.0	11	26%	-2.1
Others							
51	gi 57164373	pre-pro Serum Albumin, Ovine <b>fgt</b>	69 / 5.80	55 / 5.8	26	41%	8.4
52	gi 57164373	pre-pro -Serum Albumin, Ovine <b>fgt</b>	69 / 5.80	55 / 5.95	23	39%	-2.2

<sup>a</sup> Protein names and Accession numbers were taken from the NCBI database

<sup>b</sup> Mw and pI, both theoretical (recorded in the NCBI database) and estimated (calculated from the spot position on the gel)

<sup>c</sup> Number of peptides that matched the protein sequence and total percentage of sequence coverage

<sup>d</sup> Relative abundance TT/RR: highest average quantity / lowest average quantity. A minus sign indicates that the relative abundance of the protein is lower in the TT genotype

**Fgt**, protein fragments

Table 6. Proteins differentially expressed between Texel (N = 4) and Romanov (N = 4) genotypes in *Vastus medialis*.

<i>Vastus medialis</i>							
Spot	Accession number <sup>a</sup>	Protein ID <sup>a</sup>	Mw (kDa) / pI theoretical <sup>b</sup>	Mw (kDa) / pI estimate <sup>b</sup>	Matched peptide <sup>c</sup>	Sequence coverage <sup>c</sup>	Relative abundance TT/RR <sup>d</sup>
Energetic metabolism: Glycolytic							
53	gi 57163939	Glycogen myophosphorylase <b>fgt</b>	97 / 6.65	35 / 6.9	13	16%	-2.4
54	gi 217590	Lactate dehydrogenase-A <b>fgt</b>	34 / 8.17	15.5 / 7.15	7	20%	1.9
55	gi 61873464	Phospho-Glycerate Kinase	44.5 / 8.02	42 / 6.2	5	16%	-2.3
56	gi 59858493	Triosephosphate isomerase 1 <b>fgt</b>	27 / 6.45	20 / 5.5	10	48%	-3.2
Detoxification							
57	gi 6013379	Glutathione S-transferase Pi	24 / 7.65	24 / 7.3	5	44%	-2.0
58	gi 25108887	Antiquitin 1	55 / 6.24	55 / 5.8	13	22%	2.0
Regulators							
18	gi 57526646	Alpha-1-antitrypsin	46 / 5.83	60 / 5.1	13	29%	-2.7
Others							
59	gi 109029	Immunoglobulin heavy-chain C region	34 / 6.07	53 / 6.05	5	36%	3.2

<sup>a</sup> Protein names and Accession numbers were taken from the NCBI database

<sup>b</sup> Mw and pI, both theoretical (recorded in NCBI database) and estimated (calculated from the spot position on the gel)

<sup>c</sup> Number of peptides that matched the protein sequence and total percentage of sequence coverage

<sup>d</sup> relative abundance TT/RR: highest average quantity / lowest average quantity. A minus sign indicates that the relative abundance of the protein is lower in the TT genotype

**Fgt**, protein fragments

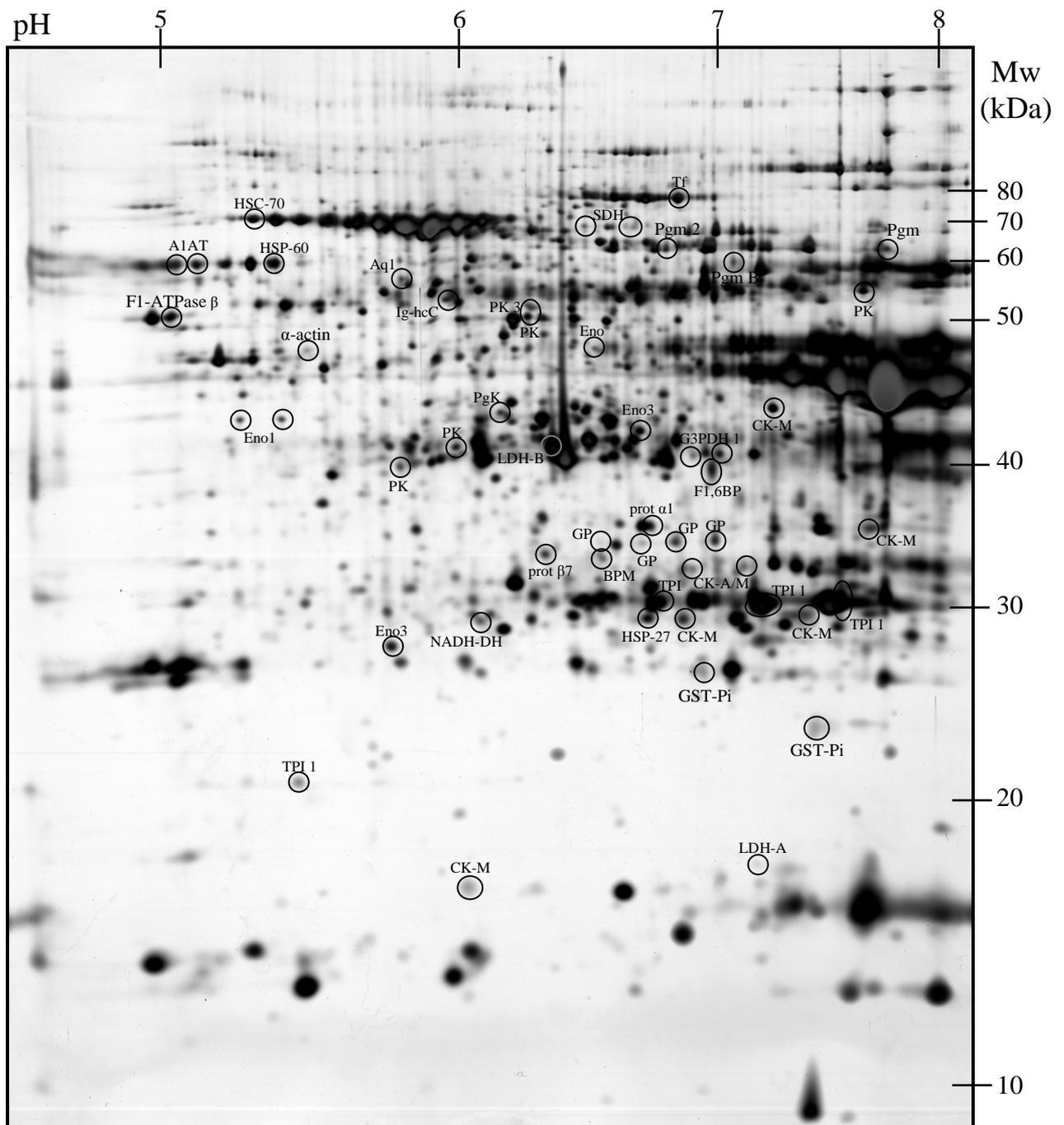


Figure 1: Representative 2-D gel map of muscle sarcoplasmic proteins. The differentially expressed proteins between Texel genotype and Romanov genotype in the four muscles are encircled (spots corresponding to pre-pro serum albumin are not shown). Abbreviations: A1AT, Alpha-1-antitrypsin; Aq1, Antiquitin 1; BPM, Biphosphoglycerate mutase; CK, Creatine Kinase; CK-M, Creatine Kinase M; CK-A/M, Creatine Kinase Chain A/M; Tf, Transferrin; Eno, Enolase; Eno1, Enolase 1; Eno3, Enolase 3; F1,6BP, Fructose-1,6-bisphosphatase 2; F1-ATPase  $\beta$ , ATP synthase F1, beta subunit; G3PDH 1, Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1; GP, Glycogen myophosphorylase; GST-Pi, Glutathione S-transferase Pi; HSC-70, Heat Shock Cognate 70; HSP-27, Heat Shock Protein 27kDa; HSP-60, Heat Shock Protein 60kDa; Ig-hcC, Immunoglobulin heavy-chain C region; LDH-A, Lactate dehydrogenase-A; LDH-B, Lactate dehydrogenase B; NADH-DH, NADH dehydrogenase; PgK, Phospho-glycerate Kinase; Pgm, Phosphoglucomutase; Pgm 2, Phosphoglucomutase 2; Pgm B, Phosphoglucomutase Chain B; PK, Pyruvate kinase; PK 3, Pyruvate kinase 3; prepro-SAO, pre-pro Serum Albumin, Ovine; Prot  $\alpha$ 1, Proteasome subunit, alpha type 1; Prot  $\beta$ 7, Proteasome subunit, beta type 7; SDH, Succinate dehydrogenase (ubiquinone); TPI, Triosephosphate isomerase; TPI 1, Triosephosphate isomerase 1;  $\alpha$ -actin, Actin alpha 1.

## *Conclusions de l'article*

Nous avons montré que l'effet de la mutation "Texel" sur les protéines sarcoplasmiques diffère en fonction du muscle étudié. Nous observons, dans les trois muscles hyper-développés, une augmentation des enzymes impliquées dans les métabolismes énergétiques, en particulier la voie glycolytique dans le cas des muscles SM et TL et à la fois les voies glycolytique et oxydative dans le cas du LD. Nous pensons que le mécanisme hypertrophique lié à la mutation de la myostatine accroît non seulement le métabolisme glycolytique, comme cela avait déjà été montré par l'étude des types de fibres et de myosines [50, 92-94] mais qu'il accroît également le métabolisme oxydatif des muscles possédant la machinerie nécessaire tel que le LD. Il serait donc intéressant de confirmer cet état de fait par l'étude d'un muscle encore plus oxydatif et également hypertrophié comme le *supraspinatus*.

La surexpression de chaperones et de protéines régulatrices est probablement liée à cet accroissement du métabolisme énergétique, autre signe d'un turnover protéique plus rapide la surexpression de sous-unités du protéasome, le système de dégradation des protéines endommagées ou à recycler.

A l'inverse dans le VM, non hyper-développé, nous observons une répression de l'expression de certaines protéines clés de la voie glycolytique (phosphoglycérate mutase) et de certaines chaperonnes (GST-Pi).

Le SM et le TL des individus TT présentent un nombre de capillaires sanguins par rapport à la surface de muscle plus faible (E. Laville, communication personnelle) d'où une irrigation sanguine plus faible pour ces muscles que pour ceux des individus RR, ainsi la surexpression de transferrine (Tf) pourrait être un mécanisme compensateur pour l'apport du fer nécessaire aux cellules. Toutefois la Tf possède également un fort potentiel myogénique et comme l'hyper-développement musculaire des individus TT est dû à une hyperplasie, il serait intéressant de suivre son expression protéique aux stades foëtaux de développement du muscle.

L' $\alpha$ 1-antitrypsine (A1AT) est la seule protéine dont l'expression est toujours sous-exprimée dans le génotype TT indépendamment du type de fibre ou du développement musculaire (hyper-développé ou non). De plus A1AT présente une affinité pour le récepteur membranaire de la Tf, elle joue le rôle d'inhibiteur compétitif de la Tf bloquant la fixation de cette dernière sur son récepteur. La diminution de son expression dans les muscles des individus TT renforcerait le signal prolifératif induit par la Tf en ne limitant plus la fixation de celle-ci sur son récepteur.

### III. L'EFFET DU GENOTYPE TEXEL SUR L'ENSEMBLE DES QUATRE MUSCLES.

L'article précédent (Chap.II. II.) montre les effets de la mutation pour chacun des muscles. Or nous avons suggéré dans le chapitre I que chaque muscle, possédant une composition particulière, est susceptible de répondre différemment à cette mutation. Nous avons d'ailleurs observé que la mutation n'affectait pas les mêmes isoformes des différents muscles. Nous avons donc réalisé une analyse globale (tous muscles confondus).

Dans cette analyse regroupant les 4 muscles et les 2 génotypes nous avons voulu déterminer si malgré les différences musculaires existantes il était possible de mettre en exergue certaines protéines spécifiques du génotype et ce quel que soit le muscle.

Suite à une ANOVA effectuée sur plus de 1000 spots protéiques il est apparu que 14 spots présentaient une différence d'expression significative en fonction du génotype. Quatre ont pu être identifiés, 2 correspondaient à la glycérol 3-phosphate déshydrogénase (SSP-6304R, SSP-6308R), un à la transferrine (SSP-6804R) et le dernier à l' $\alpha$ -1-antitrypsine (SSP-0710) [annexe I, Figure 22].

Figure 22. Expression moyenne de l'A1AT (0710), de la transferrine (6804R) et de la G3PDH (6304R et 6308R) dans l'ensemble des muscles du génotype TT et du génotype RR. (unité arbitraire: ppm). Les flèches indiquent les isoformes mises en évidence lors de la comparaison des génotypes dans les muscles séparément.

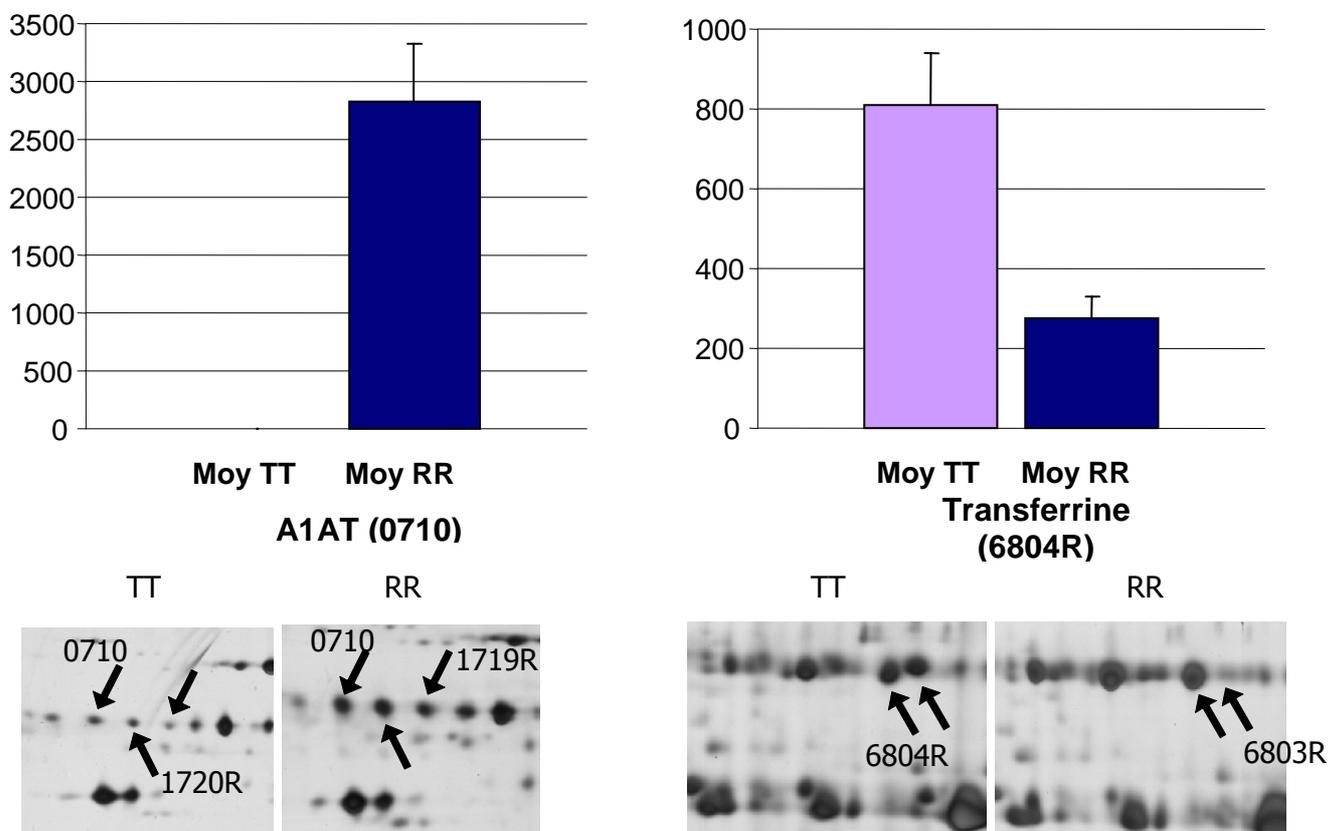
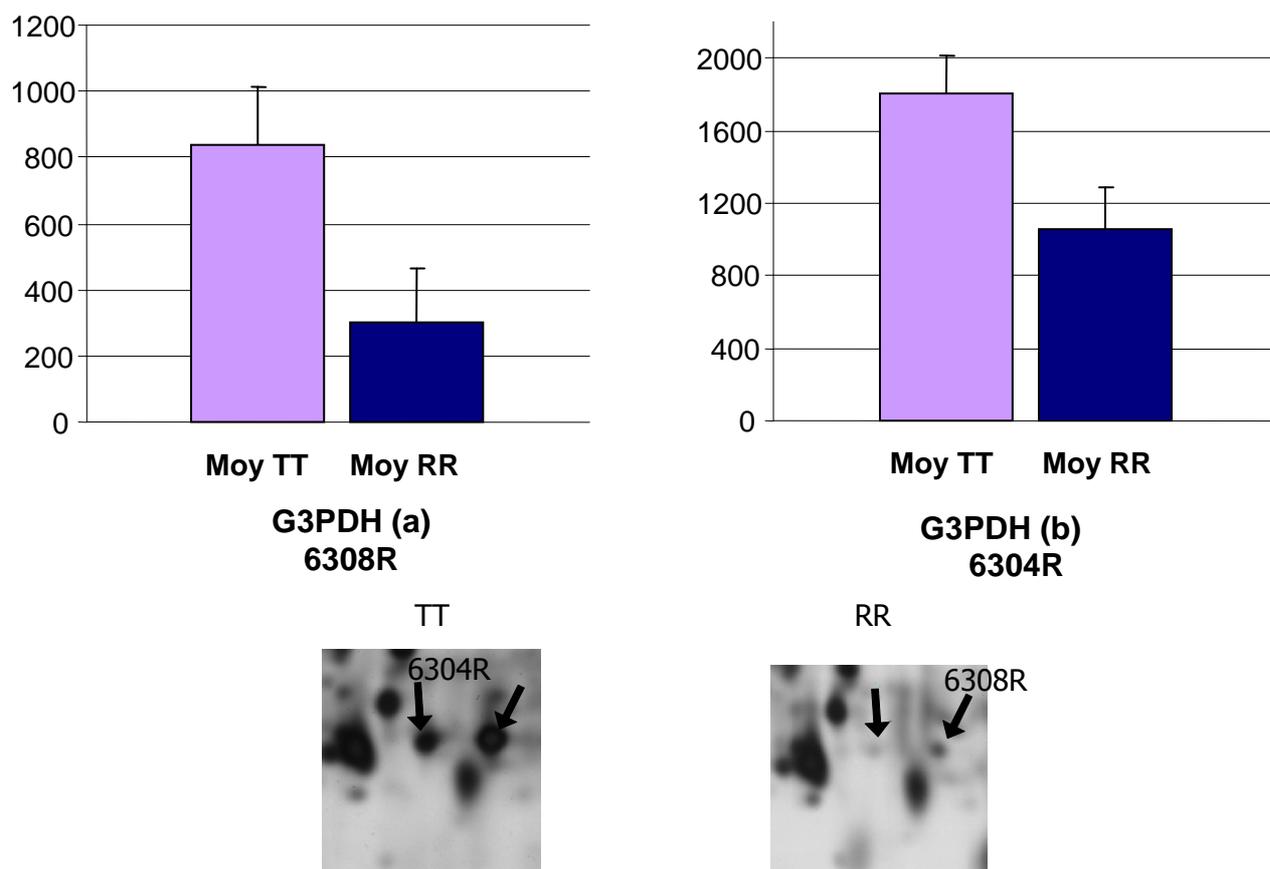


Figure 22. suite.



Ces résultats étaient attendus pour l'A1AT qui présentait une sous-expression dans l'ensemble des quatre muscles testés (Chap.II. II.), cependant c'est une 3<sup>ème</sup> isoforme, différente des 2 détectées dans l'analyse individuelle des muscles, qui a été mise en évidence dans cette analyse globale. Dans les analyses individuelles cette isoforme ne présentait qu'une tendance à la sous expression dans le génotype TT par rapport au génotype RR, tendance qui se révèle dans cette analyse globale. Finalement quel que soit l'isoforme l' $\alpha$ 1-anti trypsine est sous exprimée dans le génotype TT par rapport au génotype RR. Ces résultats font également ressortir la transferrine qui avait déjà été mise en évidence dans les muscles LD et SM. Ici aussi c'est une isoforme dont la surexpression dans le génotype TT n'avait pas franchi le seuil de  $p < 0,05$  lors des analyses individuelles de chacun des muscles. Quant à la Glycérol 3-phosphate déshydrogénase, ces 2 spots avaient déjà été mis en évidence sur 2 muscles différents, le LD et le TL. Leur mise en évidence à travers cette analyse globale montre bien que la glycolyse est affectée par la mutation Texel Belge. Sa surexpression chez les individus homozygotes Texel soutient l'hypothèse d'un métabolisme énergétique de type glycolytique plus poussé au sein de ce génotype. Comme nous l'avons décrit précédemment (Chap.II. II.), la Tf possède un fort potentiel myogénique et pourrait être impliquée dans l'hyper-développement musculaire des individus TT qui est dû à une hyperplasie. L' $\alpha$ 1-antitrypsine est la seule protéine dont l'expression, toutes isoformes confondues, est toujours sous-exprimée dans le génotype TT

indépendamment du type de fibre ou du développement musculaire (hyper-développé ou non). De plus A1AT présente une certaine affinité pour le récepteur membranaire de la Tf, elle joue le rôle d'inhibiteur compétitif de la Tf bloquant la fixation de cette dernière sur son récepteur. La diminution de son expression dans les muscles des individus TT renforcerait le signal prolifératif induit par la Tf en ne limitant plus la fixation de celle-ci sur son récepteur.

#### IV. CONCLUSIONS

D'une part la mutation Texel a pour conséquence d'atténuer les particularités des protéomes musculaires, ce qui est en accord avec les modifications de proportions des types de fibres au sein des muscles allant vers des muscles de typologie plus rapide et plus glycolytique. On observe également une forte expression des protéines associées au stress. Ce qui s'explique par le fait que le stress cellulaire est indissociable des métabolismes énergétiques qu'ils soient oxydatifs ou glycolytiques [98]; et que l'augmentation de l'expression des enzymes métaboliques suggère un métabolisme plus élevé chez les homozygotes Texel que chez les homozygotes Romanov. Un métabolisme supérieur implique une production plus importante de composés toxiques et d'oxydants à laquelle la cellule doit faire face.

D'autre part deux protéines semblent liées au génotype TT, l'A1AT et la transferrine, leur implication comme facteurs myogéniques et leurs interrelations possibles en font des marqueurs potentiels de ce génotype. Nous avons donc choisi de prolonger l'étude de l'expression de ces protéines par une analyse de l'expression de leurs ARNm.

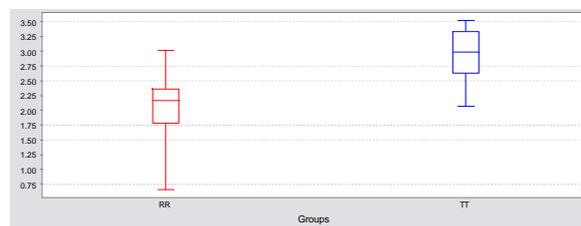
## V. ANALYSE COMPLEMENTAIRE: LA TECHNIQUE SELDI-TOF

Afin de tester le potentiel et l'utilité de la technique SELDI-TOF à explorer le sous protéome dans le cadre d'études comparatives, nous avons réalisé différents essais comparatifs entre 8 animaux TT et 8 animaux RR.

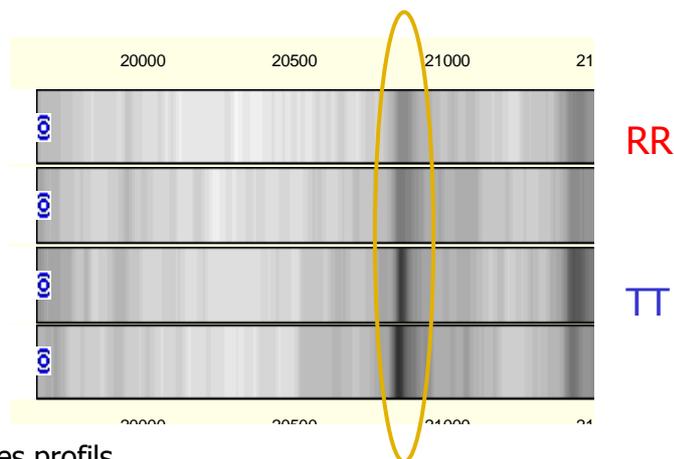
### Résultats

Pour chaque pic nous disposons des résultats exprimés sous forme de box plot, pseudo gel et de cumulation de profil comme sur l'exemple suivant pour le pic à 20840 Da isolé sur une CM10 (CM10 pH4 20840 Da,  $p=0.020$ ,  $AUC=0.875$  TT > RR) :

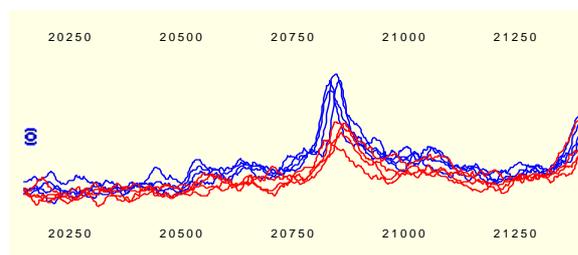
- de box plot



- de pseudo gel



- de cumulation des profils



20 protéines ont montré une différence significative ( $p<0,05$ ) de leurs intensités entre nos deux génotypes (Tableau 5).

12 protéines TT>RR			8 protéines RR>TT		
Array	Binding condition	Mass	Array	Binding condition	Mass
CM10	100 mM sodium acetate pH 4	13504	CM10	100 mM sodium acetate pH 4	<b>16922</b>
CM10	100 mM sodium acetate pH 4	20840	CM10	100 mM sodium acetate pH 4	50854
CM10	100 mM sodium acetate pH 4	56402	CM10	100 mM sodium acetate pH 6	8144
CM10	100 mM sodium acetate pH 4	66279	CM10	100 mM sodium acetate pH 6	8465
CM10	100 mM sodium acetate pH 4	66377	CM10	100 mM sodium acetate pH 6	16835
CM10	100 mM sodium acetate pH 6	11137	CM10	100 mM sodium acetate pH 6	17112
Q10	100 mM Tris pH 7	14273	CM10	100 mM sodium acetate pH 6	33902
Q10	100 mM Tris pH 7	54273	CM10	100 mM sodium acetate pH 6	34078
Q10	100 mM Tris pH 7	54710	Q10	100 mM Tris pH 8.5	<b>16921</b>
Q10	100 mM Tris pH 7	176071			
Q10	100 mM Tris pH 8.5	35871			
H50	5% ACN	5171			

**Tableau 5:** Résultats de l'analyse SELDI. Pics de masse correspondants aux protéines significativement différentes entre les génotypes RR et TT.

Parmi les trois chimies de rétention utilisées (CM10, Q10, H50)

- 14 protéines montrent une différence significative entre les deux génotypes sur la cible échangeuse de cations (CM10) à 2 pH différents.

- 6 protéines montrent une différence significative entre les deux génotypes sur la cible échangeuse d'anions (Q10) à 2 pH différents.

- 1 protéine montre une différence significative entre les deux génotypes sur la cible de phase inverse (H50).

Nous pouvons constater qu'une même protéine est accrochée par deux cibles différentes (masse de 16922 Da sur CM10 et 16921 sur Q10).

Au niveau des poids moléculaires nous observons que 10 protéines ont une masse <20 kDa, 9 protéines ont une masse comprise entre 30 et 70 kDa et 1 de masse >100 kDa.

### *Discussions*

L'approche SELDI-TOF est essentiellement utilisée dans le milieu médical comme outil de diagnostic et de recherche de biomarqueurs [99]. L'essai que nous avons réalisé avec cet outil sur un thème de recherche agronomique, nous a apporté plusieurs informations. En tout premier lieu il nous apparaît évident que la mise en œuvre de cet outil est rapide. En effet il a suffi de quatre jours de travail pour aboutir à ces résultats préliminaires en travaillant avec 16 animaux au total. Cette rapidité sous-entend qu'il est possible de travailler sur un grand nombre d'animaux dans le but de trouver des protéines caractéristiques d'un génotype par exemple. Ce type d'appareil dispose en effet d'un logiciel de traitements de

données permettant l'analyse de nombreux échantillons. L'inconvénient du nombre est que la reproductibilité des profils devient primordiale ce qui nécessite l'emploi d'un robot afin de traiter l'échantillon de la manière la plus standardisée.

L'un des autres avantages est la possibilité de pouvoir fractionner nos échantillons protéiques en jouant sur plusieurs propriétés physico-chimiques des protéines. Nos résultats montrent que l'emploi de différentes surfaces ou de différents protocoles de préparation de l'échantillon (pH pour les échangeurs ioniques par exemple) permet de mettre en évidence différentes protéines cibles. On observe en effet 1 protéine redondante entre les CM10 et les Q10. L'inconvénient explicite de l'augmentation des sous fractions étudiées est que l'on se retrouve à multiplier le nombre d'expériences. Par contre, cela peut être envisagé comme un test préparatif destiné à choisir un type de cible et de protocole permettant de définir les conditions optimales pour observer le maximum de différences entre nos génotypes.

L'un des aspects cruciaux que nous n'avons pu tester est l'aspect identification du pic discriminant. En effet le fait d'avoir recours à des systèmes de colonnes et d'électrophorèse pour purifier le pic d'intérêt présente beaucoup d'inconvénient et nécessite la présence de la protéine d'intérêt en grande quantité.

Cette approche a montré des résultats intéressants quand aux possibilités d'utilisation de cet appareil. En revanche, il reste à tester d'autres éléments comme la cible de type IMAC pour une étude plus axée sur le phospho-protéome par exemple. En effet les aspects de modifications post-traductionnelle ne sont pas pris en compte sur les autres types de cibles. Il serait aussi nécessaire de tester les possibilités d'identification des pics d'intérêt afin de définir des pourcentages de réussite d'une telle action.

# CHAPITRE III. ÉTUDE DU TRANSCRIPTOME

## INTRODUCTION

A la suite des analyses du protéome présentées dans les chapitres I et II, nous nous sommes interrogés sur le niveau de régulation de certaines de ces protéines. Était-ce une régulation au niveau de la traduction (synthèse protéique) ou bien prenait-elle place en amont au niveau de la transcription (expression génique, synthèse des ARNm). En effet, les analyses d'électrophorèses bidimensionnelles permettent de mettre en évidence les voies métaboliques impliquées dans un phénotype mais pas sa mise en place.

Étant donné que le phénotype Texel résulte essentiellement d'une augmentation du nombre de fibres musculaires et que la prolifération des cellules musculaires a lieu principalement au stade fœtal, il nous a semblé intéressant de contrôler l'expression de certains gènes à la fois au stade sub-adulte (3 mois) et aux stades fœtaux couvrant la période de prolifération des cellules musculaires (50, 70 et 90 jours). Ces stades ont été déterminés par analogie aux stades de développements musculaires chez le bovin.

Nous avons choisi de quantifier l'expression de cinq gènes en nous appuyant sur deux critères de sélection. D'une part les gènes présents dans le QTL et donc candidats potentiels et d'autre part les gènes correspondants aux protéines différemment exprimées entre les génotypes homozygotes (TT et RR). Tout d'abord la myostatine et SLC40-A1 deux gènes localisés dans le QTL Texel, à l'époque l'équipe de Michel Georges n'avait pas encore décrit la mutation et son mode d'action. Il nous semblait nécessaire vu les similitudes entre le phénotype hyper-musclé Texel et le "Double Musclé" bovin d'étudier l'expression de la myostatine, non seulement à l'âge adulte mais également chez les fœtus. Et ce bien que nous ne l'ayons pas mise en évidence sur les gels d'électrophorèse bidimensionnelle. Son expression est à un niveau basal très faible chez l'adulte. Seuls les phénomènes de régénération musculaire après lésion permettent de mettre en évidence son expression. SLC40-A1, ce gène codant pour un récepteur cellulaire du fer était, quant à lui, un candidat potentiel au titre de "gène porteur de la mutation Texel". Une étude de comparaison de génotype sur pools de muscle SM avait montré une sous-expression des ARNm de ce gène dans le génotype TT par rapport au génotype RR (D. Milenkovic, communication personnelle).

Parmi les protéines différemment exprimées entre génotype TT et RR nous avons sélectionné la Glutathion S-transférase Pi, cette chaperone est associée à la lutte contre le stress oxydant, elle fixe le glutathion sur les composés toxiques pour la cellule inactivant ainsi leur potentiel cytotoxique. Au niveau protéique l'expression de deux de ses isoformes est influencée par le génotype TT, elle est même sous exprimée dans le muscle VM des TT.

Nous avons également testé l'expression des ARNm de la transferrine, un facteur de prolifération myoblastique ayant un rôle clef dans le métabolisme du fer, et présentant une surexpression protéique dans les muscles hypertrophiés TT. Le dernier gène que nous avons testé est l' $\alpha$ -1-antitrypsine. Sa sous-expression dans tous les muscles étudiés des individus TT, y compris le VM non hyper-développé en faisant un marqueur potentiel du génotype TT, et les possibilités d'interaction de cette protéine avec la voie de signalisation de la transferrine en ont fait un candidat intéressant pour les études de quantification par transcription inverse PCR-en temps réel (RT-PCR temps réel).

Comme pour l'étude de protéomique nous avons comparé l'expression des ARNm des animaux homozygotes TT à celle des animaux homozygotes RR pour chaque muscle fœtal et subadulte, puis nous avons comparé l'expression des ARNm entre les différents types musculaires (VM, SM, fœtus).

## EXTRACTIONS ET AMPLIFICATIONS

Les prélèvements ont été effectués immédiatement après les sacrifices (fœtus et agneaux de 3 mois) et congelés dans l'azote liquide. Cependant à la suite d'un problème de stockage les échantillons de muscle de fœtus de 50 jours se sont révélés inutilisables pour l'analyse transcriptomique, les ARN étant trop dégradés (cf. Figure 23, individus F30, F31 et F32). Quant aux échantillons prélevés à 90 jours nous n'avons pas réussi à extraire d'ARN exploitables (Figure 23), bien qu'ils aient été traités selon le même protocole que les prélèvements à 70 jours et les autres types musculaires. C'est-à-dire que, bien qu'une série d'extractions contenait toujours des échantillons de muscles de sub-adultes et des échantillons fœtaux 70 ou 90 jours, seuls les ARN à 90 jours n'ont pas été extraits. Peut-être y a-t-il dans le muscle des fœtus ovins de 90 jours un composé qui interagit avec le kit d'extraction et limite l'extraction des ARN. Il faudrait tester d'autres kits pour s'en assurer. D'autre part, le génotypage *a posteriori* des fœtus a montré un déséquilibre dans la répartition des trois génotypes (TT, RR et RT) dans le lot de 70 jours. Alors qu'on espérait une descendance contenant 50% d'hétérozygotes et 25% de chacun des génotypes parentaux (TT, RR). Il s'est avéré que sur 14 fœtus prélevés à 70 jours un seul était homozygote RR, 3 étaient hétérozygotes et 10 étaient homozygote TT (cf. Annexe II; tableaux des individus).

Puisque tous les échantillons ne fournissent pas la même quantité d'ARN lors de l'extraction, il a été nécessaire d'adapter les quantités utilisées pour réaliser la transcription inverse. La transcription se faisant à l'aide d'amorces de types hexamères aléatoires, les ARNm totaux extraits ont été rétro-transcrits à partir de 5, 2 ou 1  $\mu$ g d'ARN en fonction de la concentration initiale des échantillons (Annexe II). Les ADNc représentant la totalité des ARN présents ont ensuite été dilués pour que tous les dépôts soient à la même concentration lors de la PCR en

temps réel. Etant donné que tous les ARN ont été rétro-transcrits, et pas seulement les messagers à queue polyA, la quantité détectée d'ARN d'un gène lors de la PCR en temps réel sera représentative et comparable au sein des différents types musculaires.

Pour servir de référence aux analyses individuelles nous avons constitué des pools de 5 individus en mélangeant leurs ARN avant la phase de transcription inverse. La quantité totale d'ARN retrotranscrits pour chaque pool (SM-RR, SM-TT et SM RT) était de 5 µg. Le pool SM-TT a été constitué à partir des animaux 2, 14, 19, 26 et 34. Le pool SM-RR était constitué des animaux 10, 22, 27, 36 et 31. Quant au Pool RT il était constitué des animaux 3, 12, 13, 15 et 21. (Annexe II). Nous avons utilisé les valeurs du pool SM-RR comme référence pour comparer les expressions dans le muscle *semimembranosus*. Nous avons pas réalisé de pools "réels" pour le muscle *vastus medialis*, l'étude sur les pools SM nous ayant montré que le pool n'était pas forcément représentatif de la moyenne de l'ensemble des individus. Pour le VM, la référence a été créée "artificiellement" grâce au logiciel SDS2.2.2. à partir de l'ensemble des amplifications des individus RR. Etant donné la répartition déséquilibrée des génotypes chez les fœtus, nous avons utilisé les données d'expression du seul fœtus RR comme référence pour l'analyse dans le muscle foetal.

Nous avons testé les différentes amorces PCR, au cours d'une PCR classique pour nous assurer de leur spécificité. Les premières amorces dessinées pour la cyclophiline (PPIA\_2) se sont révélées peu spécifiques comme on peut le voir sur la Figure 25, alors que l'amplification avec les amorces de la GAPDH nous donne une bande unique et intense. Les amorces qui présentaient des défauts (amplifications multiples, amplification faible) ont été re-dessinées jusqu'à l'obtention d'une amplification unique et intense (tableau 6.).

Gène		Amorces
Transferrine	Sens	5'-GAA CAC TGA AGA ATG CAT CGC C-3'
	Anti-sens	5'-GGT AGC CTC CAT CCA AGC TCAT-3'
GST-Pi	Sens	5'-CAC TCA AGG CCT CCT GCC TAT A-3'
	Anti-sens	5'-GAT GGC ATT GGA CTG ATA CAG C-3'
A1AT	Sens	5'-CGG CAA TGG TCT GTT CAT CA-3'
	Anti-sens	5'-CCT CAG CAT CCC TGA AGT TGA-3'
SLC40-A1	Sens	5'-TCC AGT TAT GGC TGA CGC TC-3'
	Anti-sens	5'-CCT CTA TAT GAC TGT CCT GG-3'
Myostatine	Sens	5'-CCA CTC CGG GAA CTG ATT GAT-3'
	Anti-sens	5'-CAGACTCCGTGGGCATGGTAAT-3'
GAPDH	Sens	5'-GGCATCGTGGAGGGACTTATG-3'
	Anti-sens	5'-GCCATCACGCCACAGCTT-3'
Cyclophiline A	Sens	5'-GCTCTGAGCACTGGAGAGAAAGG-3'
	Anti-sens	5'-CTTGCTGGTCTTGCCATTCC-3'

**Tableau 6.** Séquences des différentes amorces PCR utilisées.

Finalement, l'amplification pour chaque couple d'amorces sélectionnées a été testée sur 5 dilutions d'ADNc sur l'appareil de PCR Temps réel ce qui nous a permis de contrôler la sensibilité et la spécificité des amorces sur cet appareil. Nous avons également utilisé un deuxième couple d'amorce pour le gène de la myostatine (GDF8-LIM) qui amplifie une région différente de celle des amorces GDF8. Ce qui nous permet de contrôler les résultats obtenus avec notre couple GDF8. Ce couple d'amorce, GDF8-LIM, nous a été fourni par l'équipe de Limoges.

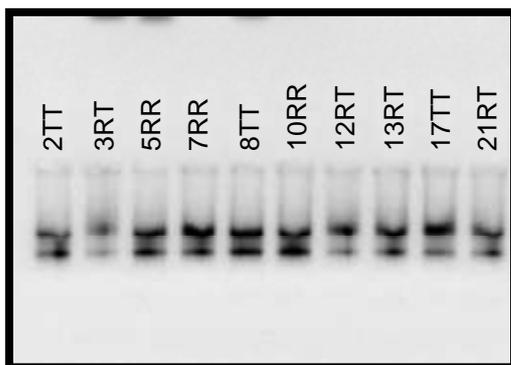
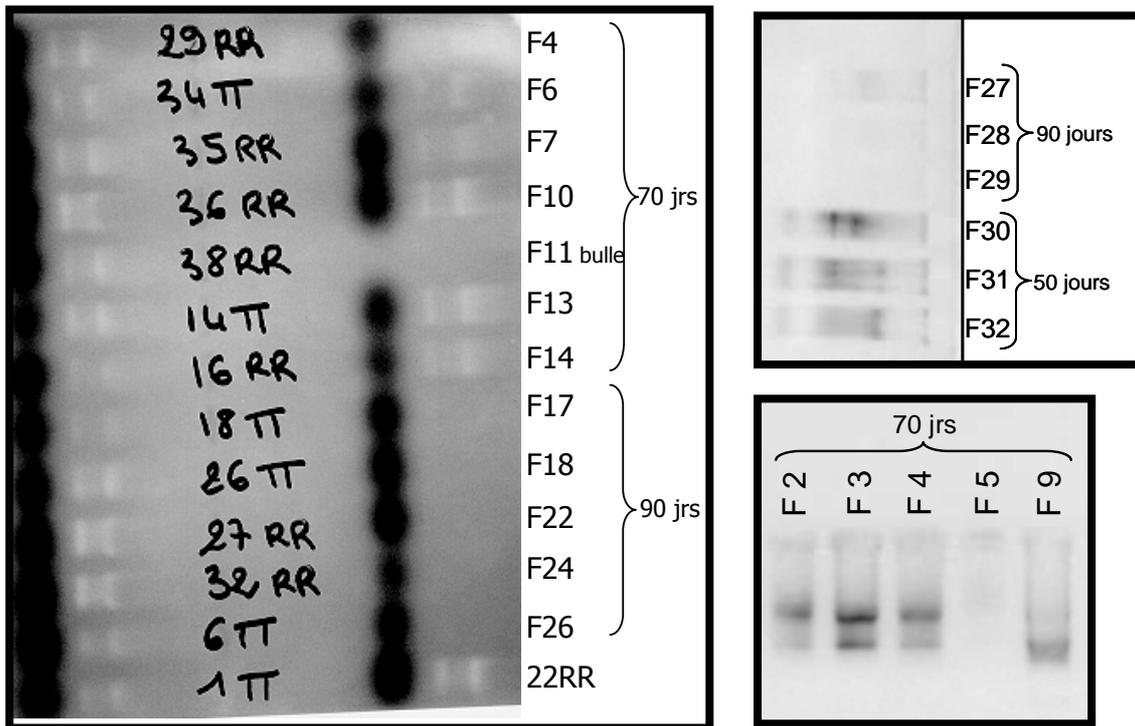


Figure 23. Exemples de migration de contrôle des ARN sur gel d'agarose 1%. Muscles Foetaux et *semimebranosus*. Visualisation des 2 bandes majoritaires, les ARN 16S et 28S. A 50 jours les ARN étaient dégradés.

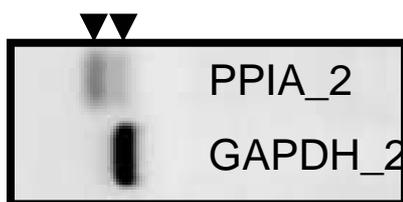


Figure 24. Exemples d'amplifications PCR tests. PPIA\_2: Cyclofilin; GAPDH\_2: Glyceraldéhyde déshydrogénase.

## RESULTATS & DISCUSSION

Une fois ces mises au point effectuées, nous avons amplifié et quantifié tous les échantillons de foetus, de *vastus medialis* et de *semimembranosus* (agneaux de 3 mois). Pour chaque comparaison les données RR ont servi de référence. Les résultats d'expression pour chaque échantillon sont présentés dans l'annexe II.

Les tableaux qui suivent présentent les valeurs moyennes d'expression des ARNm dans les différents types musculaires pour les différents génotypes; lorsque le rapport d'expression moyen ( $\bar{x}$ ) était inférieur à 1 nous avons indiqué en dessous le facteur d'expression correspondant en calculant la valeur  $(-1/\bar{x})$ , ce qui permet de mieux visualiser le facteur de différence. Les moyennes sont exprimées  $\pm$  Erreur Standard.

### *Différences intergénotype dans le muscle foetal*

Foetus	SLC40A1	GDF-8	GDF-8-LIM	GST	TF	A1AT-1
F-RR	1	1	1	1	1	1
moy F-TT	1.26 $\pm$ 0.09	0.62* $\pm$ 0.04 -1.62	0.66* $\pm$ 0.02 -1.52	1.19 $\pm$ 0.06	1.11 $\pm$ 0.14	1.07 $\pm$ 0.15
moy F-RT	1.00 $\pm$ 0.11	0.68 $\pm$ 0.10 -1.48	0.79 $\pm$ 0.07 -1.27	1.10 $\pm$ 0.08	0.65 $\pm$ 0.04 -1.53	1.12 $\pm$ 0.29

**Tableau 7.** Expression des ARN Foetaux. Les valeurs de Ct ont été comparées à celle du seul individu RR grâce au logiciel SDS2.2.2. \*:p<0.05 pour un test non paramétrique de Mann-Whitney.

L'étude des ARNm des muscles foetaux à 70 jours ne nous a apporté que très peu d'information. Le hasard de la génétique a voulu que nous n'ayons qu'un seul individu homozygote RR comme base de comparaison, ces résultats n'ont donc pas de valeur statistique réelle. Toutefois si nous considérons cet individu comme représentatif de son groupe et que nous le comparons à la valeur moyenne de l'expression des individus TT (10 individus) et RT (2 individus) nous pouvons dégager de ces résultats (Tableau 7) une tendance à la sous-expression des ARNm de la myostatine (GDF-8) chez les individus TT avec un rapport d'expression<sup>1</sup> RR/TT égal à 1,70. Les ARNm de la myostatine sont également légèrement sous-exprimés chez les hétérozygotes (RR/RT = 1,48). Cette expression diminuée est en accord avec les effets de la mutation Texel décrits par l'équipe de Michel Georges, le site cible des miARN créé sur l'allèle Texel entraîne une dégradation du message, d'où une quantité inférieure d'ARNm de la myostatine chez les hétérozygotes et surtout chez les homozygotes TT [2]. Les deux couples d'amorces pour la myostatine nous

<sup>1</sup> Les rapports d'expression sont tous présentés dans le sens positif; une sous-expression chez les TT est associée à un rapport RR/TT et une sur-expression à un rapport TT/RR.

ont fourni des résultats similaires. Ces 2 couples étaient situés dans deux régions différentes du gène, cette corrélation entre les deux couples montre bien que l'ensemble du transcrit est affecté et que la diminution d'expression des ARNm de la myostatine n'est pas artéfactuelle. Les autres gènes étudiés (SLC40-A1, GST- $\pi$ , A1AT, Tf) ne présentent pas de différence d'expression des ARNm, mis à part pour les ARNm de la transferrine (Tf) qui pourraient être moins exprimés chez les hétérozygotes que chez les homozygotes. (cf. Tableau 7 et Annexe II)

### *Différences intergénotypes dans le Vastus medialis*

<b>Vastus medialis</b>	SLC40A1	GDF-8	GDF-8-LIM	GST	TF	A1AT-1
VM-RR artificiel	1	1	1	1	1	1
moy VM-TT	1.44 ± 0.63	1.05 ± 0.41	1.08 ± 0.40	1.31 ± 0.50	0.96 ± 0.11 -1.05	3.30 ± 1.23
moy VM-RR	1.16 ± 0.21	1.11 ± 0.25	1.21 ± 0.27	1.08 ± 0.19	1.09 ± 0.19	1.77 ± 0.83

**Tableau 8.** Expression des ARN du *vastus medialis*. Les valeurs de Ct ont été comparées à celle d'un pool RR créé artificiellement à partir de toutes les données RR grâce au logiciel SDS2.2.2.  $p > 0.05$ .

L'étude de l'expression des ARNm dans le VM (4TT, 9RR) des animaux âgés de trois mois, ne nous a pas permis de mettre en évidence de différence significative. Nous avons observé une tendance à la sur-expression des ARNm de l'A1AT (TT/RR = 2,21) et une sous-expression de ceux de la myostatine (RR/TT = 1,47) chez les homozygotes TT. Les autres gènes (SLC40-A1, GST- $\pi$ , Tf) ne présentant aucune différence d'expression. (Tableau 8)

### *Différences intergénotypes dans le Semimembranosus*

<b>Semimembranosus</b>	SLC40A1 ( $p=0.051$ )	GDF-8**	GDF-8-LIM**	GST	TF	A1AT-1 ( $p=0.094$ )
POOL SM-RR	1	1	1	1	1	1
POOL SM-TT	-1.52	-1.67	-1.80	-1.39	-1.27	2.62
POOL SM-RT	-2.78	-1.38	-1.42	-1.75	-1.52	-1.11
moy SM-TT	0.78 ± 0.21 -1.29	0.79 ± 0.21 -1.26	0.87 ± 0.23 -1.15	1.18 ± 0.32	1.06 ± 0.28	6.26 ± 1.67
moy SM-RR	1.08 ± 0.27	1.38** ± 0.35	1.52** ± 0.38	1.31 ± 0.33	1.18 ± 0.30	2.64 ± 0.66
moy SM-RT	0.42 ± 0.17 -2.39	0.80 ± 0.33 -1.25	0.82 ± 0.34 -1.22	0.82* ± 0.34 -1.21	0.92 ± 0.37 -1.09	3.77 ± 1.54

**Tableau 9.** Expression des ARN du *Semimembranosus*. POOL: pool physique obtenu par mélange des ARN de 5 individus. Le pool physique RR a servi de référence. Différence entre les 3 génotypes \* :  $p \leq 0.05$ ; \*\*:  $p \leq 0.01$ .

Nous n'avons pas détecté de différence d'expression pour la Tf et SLC40-A1 dans le *semimembranosus* des animaux âgés de 3 mois (14TT, 16RR, 6RT). Nous avons mis en évidence une légère différence d'expression du gène de la GST- $\pi$  chez les hétérozygotes par rapport aux 2 génotypes homozygotes (Tableau 9). L'étude d'expression sur le SM nous a surtout permis de montrer que les ARNm de la myostatine sont moins exprimés ( $p=0,01$ )

chez les TT que chez les RR (RR/TT = 1,75). Ainsi nous avons montré que l'expression des messagers de la myostatine était diminuée chez le fœtus TT mais aussi chez le sub-adulte. Nous ne pouvons que décrire une tendance à la sur-expression de A1AT chez les TT (TT/RR = 1,41;  $p=0,072$ ), toutefois nous avons dû exclure l'animal 23TT dont l'expression faussait l'analyse (cf. Annexe II,  $R_{23TT} = 39,3$  alors que la moyenne des  $R_{TT} = 3,71$ ), une étude basée sur un plus grand nombre d'individus permettrait de déterminer si cette expression de A1AT dans le SM de l'individu 23TT est un phénomène isolé, une erreur de mesure ou bien un marqueur de la surexpression de ce gène dans le SM des TT.

Il est intéressant de voir que nous avons également une tendance à la surexpression de A1AT dans le VM des TT. Cette sur-expression des ARNm semble paradoxale au vu de la sous-expression de la protéine A1AT dans les muscles des individus TT. L'hypothèse que nous pouvons avancer est que l'absence de protéine pousse le système à synthétiser plus de messagers en une tentative de rééquilibrage, une forme d'auto-régulation de la synthèse des messagers comme c'est le cas pour la synthèse de tubuline. L'absence de monomères de tubuline libres est corrélée à l'augmentation des ARNm de tubuline [100, 101]. Cependant cette hypothèse n'est basée que sur une tendance à la surexpression dans le muscle TT des ARNm de A1AT, il faut encore confirmer cette observation sur un plus grand nombre d'échantillons.

### *Comparaison des différents muscles*

Nous avons également procédé à une comparaison de l'expression dans les différents muscles (SM vs VM vs Fœtus; cf. Tableau 10) et nous nous sommes aperçu que nos gènes de référence n'étaient pas stables d'un muscle à l'autre. C'est-à-dire que leur expression variait en fonction du muscle, ils ne pouvaient donc pas nous servir de base pour le calcul du rapport (R) des Ct (cycle seuil, cf. Matériel & Méthode). Sachant que la même quantité (5 µg par puits) d'ADNc avait été déposée, les différences de Ct entre muscles devaient donc traduire les différences d'expression des ARNm. Nous nous sommes donc basés sur le Ct brut pour les comparer. Nous avons donc fait la moyenne des Ct de chacun des muscles (RR et TT confondus). Pour le génotype TT nous avons pris les Ct du pool SM TT comme référence, de même pour le génotype RR nous avons pris le Pool SM RR; et nous avons appliqué la formule suivante: Expression du gène =  $2^{\Delta Ct}$

$$\text{où } \Delta Ct = Ct_{\text{poolSM}} - Ct_{\text{muscle(SM, VM, Muscle Fœtaux)}}$$

nous avons ensuite comparé les expressions les unes aux autres en faisant le rapport:

$$(\text{Expression muscle 1}) / (\text{Expression muscle 2}).$$

La transferrine (Tf), la myostatine et l' $\alpha$ 1-antitrypsine (A1AT) se sont révélées être fortement exprimées chez les fœtus de 70 jours par rapport aux muscles adultes. Bien que nous

n'ayons pas montré de différence significative d'expression des ARNm entre homozygotes TT et RR pour les gènes de la Tf et de A1AT, leur forte expression fœtale incite à penser qu'ils jouent un rôle important dans le développement du muscle. En effet, l'A1AT est un inhibiteur potentiel de l'action proliférative de la transferrine [97].

La comparaison des 2 muscles adultes, SM et VM, montre que SLC40-A1 est plus exprimé dans le VM que dans le SM. Le VM est un muscle plus oxydatif que le SM, on peut supposer qu'il sollicitera plus le métabolisme du fer d'où l'expression plus forte de SLC40-A1. Quant à la myostatine elle semble plus exprimée dans le SM que dans le VM, son influence sur le développement du muscle pourrait être plus forte sur le SM que sur le VM.

	F / VM	F / SM	VM / SM
SLC40A1	-1.4	1.4	2.1
GDF8	3.3	2.0	-1.7
GDF8-LIM	4.0	1.9	-2.2
GST-Pi	-1.8	-1.9	-1.1
TF	2.4	2.8	1.2
A1AT-1	65.7	73.2	1.1
CYCLO	6.5	4.7	-1.4
GAPDH	-8.2	-19.1	-2.3

**Tableau 10:** Rapports des expressions des ARNm des différents gènes dans les différents muscles analysés. F: muscle fœtal; SM: *semimembranosus*; VM: *vastus medialis*; RR et TT: respectivement, homozygotes Romanov ou Texel au locus; CYCLO: cyclophiline; GAPDH: glycéraldéhyde 3-Phosphate déshydrogénase. Le signe négatif témoigne d'un rapport inverse, si F/VM= 2 cela signifie que le gène est 2 fois plus exprimé dans le muscle fœtal, si F/VM= -2 cela signifie que le gène est 2 fois moins exprimé dans le muscle fœtal. Un facteur d'expression  $<|2|$  n'est pas significatif dans cette étude.

## CONCLUSIONS

L'étude de l'expression des ARNm nous a permis de montrer que la quantité de protéines GST- $\pi$ , TF, et A1AT dans les muscles était vraisemblablement régulée par des phénomènes post-transcriptionnels. Dans le cas de l'A1AT la tendance à la sur-expression des ARNm dans les muscles TT pourrait être expliquée par un phénomène de rétrocontrôle négatif résultant de la sous-expression des protéines A1AT. Ce qui correspond effectivement à une régulation au niveau post-transcriptionnel voire au niveau traductionnel. L'expression des ARNm au stade fœtal est très différente de l'expression au stade adulte. Ainsi A1AT, la myostatine et la transferrine sont bien plus exprimées chez le fœtus, ce qui laisse supposer un rôle majeur dans le développement musculaire. Nous avons également mis en évidence la sous-expression de la myostatine dans les muscles TT, confirmée par une tendance à la sous-expression chez le fœtus TT. Ce qui est en accord avec la mutation sur le gène de la

myostatine décrite par Clop *et al.* (2006) [2] et qui correspond bien aux mutations bovines amenant au phénotype Double-Muscled. De plus l'expression plus importante des ARNm de la myostatine relevée dans le SM par rapport au VM, semble indiquer que son influence sera plus forte sur le développement du SM que sur celui du VM. Ainsi le VM ne sera pas autant affecté par l'absence de myostatine que le SM. Il serait intéressant de faire les analyses sur d'autres muscles hyper-développés ou non pour confirmer cette hypothèse.

## CHAPITRE IV. CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Le modèle "Texel Belge" est un modèle complexe. Avant même de connaître la mutation décrite par Clop et al. (2006) [2], l'expression du phénotype dans la descendance F2 laissait supposer l'existence d'un gène majeur influencé par le fond génétique. Nous savions que les fibres musculaires des animaux Texel Belge étaient plus riches en myosine de type II [61] et que les muscles avaient une typologie plus rapide et plus glycolytique, phénomène similaire à celui observé chez les bovins hyper-musclés [93-95]. Pour cette étude, nous nous sommes affranchis des protéines myofibrillaires (myosine, actine, tropomyosine...), les plus représentées dans le muscle, en adaptant la technique d'extraction fractionnée de Pietrzak et al. [78]. D'autre part pour étudier les effets propres à la mutation "Texel", nous avons dans un premier temps comparé les différents muscles entre eux. Cette connaissance du protéome des différents muscles nous a permis d'analyser les différences dues à la mutation. Cette étude du protéome sarcoplasmique de quatre muscles – *vastus medialis* (VM), *semimembranosus* (SM), *longissimus dorsi* (LD) et *tensor fasciae latae* (TL) – a montré que les différents muscles ne possèdent pas le même répertoire enzymatique. Les enzymes sont présentes sous plusieurs isoformes dont les proportions respectives varient en fonction du type musculaire. De plus l'expression de certaines protéines permettrait de distinguer les muscles les uns des autres telles la parvalbumine, la Fatty-acid-binding-protein (FABP-H) et la 20  $\alpha$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (20  $\alpha$ -HSD). En effet la parvalbumine accélère la vitesse de relaxation [102], elle est très exprimée dans le TL, muscle glycolytique rapide. La FABP-H favorise le transfert des acides gras dans la mitochondrie et donc leur utilisation par la mitochondrie pour la synthèse d'ATP au cours de la  $\beta$ -oxydation, c'est d'ailleurs dans le VM qu'elle est la plus exprimée, ce qui est en accord avec l'étude de Glatz *et al.* (2003) [103] montrant une expression plus élevée de FABP-H dans les muscles oxydatifs. Quant à la 20  $\alpha$ -HSD elle dégrade la progestérone en 20  $\alpha$ -hydroxyprogestérone 'inactive'. Or la progestérone 'active' inhibe les effets activateurs des oestrogènes sur le métabolisme et en particulier sur l'oxydation des acides gras. La 20  $\alpha$ -HSD favoriserait donc une accélération du métabolisme [104], elle est d'ailleurs exprimée en plus grande quantité dans le muscle le plus oxydatif, le VM, et le moins exprimée dans le muscle le plus glycolytique, le TL.

D'autre part nous avons montré que certains muscles se différenciaient plus des autres, tel le VM dont 17 protéines permettent de le distinguer. Il a un taux élevé d'enzyme du métabolisme oxydatif associé à un taux élevé de protéines impliquées dans la régulation du stress oxydant et du turnover protéique. A l'inverse le SM est celui qui se différencie le moins (9 spots), sa principale caractéristique est la présence de fragments protéiques en plus grande quantité que dans les autres muscles suggérant une protéolyse peut-être favorisée

dans ce muscle. Le muscle qui présente la plus faible expression d'enzymes oxydatives est le TL. Par contre il a une expression assez élevée d'enzymes couramment associées à la régulation du stress oxydant. Toutefois il a été décrit par Bloomer *et al.* (2004) [99] que le métabolisme anaérobie (glycolytique) génère un stress oxydant au moins aussi important que le métabolisme aérobie (phosphorylation oxydative et  $\beta$ -oxydation). Le LD présente un profil d'expression intermédiaire tant sur le plan du métabolisme oxydatif que glycolytique, et un taux moindre de protéines associées au stress suggérant un stress métabolique moins important lié, peut-être, à sa relative richesse en fibres IIA. L'étude de muscles exclusivement oxydatifs, de typologie plus tranchée, pourrait fournir des informations supplémentaires sur les différences entre muscles.

Ces résultats laissent supposer également que les effets d'une mutation affectant les muscles n'auront pas les mêmes répercussions en fonction du muscle étudié et que l'étude d'un seul muscle ne permet pas de généraliser les résultats aux autres.

De fait, en comparant le génotype homozygote Texel (TT) au génotype homozygote Romanov (RR) pour chacun des muscles séparément, nous avons montré que les protéines différentiellement exprimées n'étaient pas les mêmes. C'est-à-dire que bien que nous observions dans les trois muscles hyper-développés (LD, TL et SM) une augmentation des enzymes impliquées dans les métabolismes énergétiques, en particulier la voie glycolytique dans le cas des muscles SM et TL et les deux voies en même temps pour le LD, ce ne sont pas les mêmes spots et donc pas les mêmes isoformes qui sont utilisées selon le muscle. Il semble tout de même que l'hyper-développement associé à la mutation met en jeu non seulement un accroissement du métabolisme glycolytique, comme en témoignaient les études sur les changements de types de myosine [50], mais aussi du métabolisme oxydatif dans les muscles possédant l'équipement nécessaire à la phosphorylation oxydative et à la  $\beta$ -oxydation (mitochondries). La surexpression des chaperonnes et des protéines régulatrices (HSC-70, HSP-27, GST-Pi...) est probablement liée à cette demande métabolique accrue et à la production d'oxydants et de composés toxiques pour la cellule. Nous avons d'ailleurs relevé d'autres marqueurs d'un métabolisme énergétique accéléré avec la surexpression de sous-unité du protéasome, signe d'un turnover protéique plus intense dans les muscles des individus TT. En revanche dans le muscle VM qui n'est pas hyper-développé il n'y a pas cette surexpression d'enzymes métaboliques ni des protéines associées au stress, nous observons même une diminution de la phosphoglycérate mutase, une enzyme clef de la glycolyse, et de la GST-Pi.

D'autre part deux protéines ont été mises en évidence comme étant exprimées de la même façon à travers tous les muscles en fonction du génotype, la transferrine et l' $\alpha$ -1-antitrypsine. Pour ces deux protéines différents spots ont été mis en évidence. La transferrine est surexprimée dans le génotype TT. Deux spots de transferrine, un plus particulièrement

associé aux muscles LD et SM et un qui s'est révélé lors de l'analyse combinée de tous les muscles. Elle pourrait être associée à un mécanisme compensateur de la plus faible irrigation sanguine des muscles SM et TL, mais elle est surtout un facteur myogénique qui pourrait être directement impliqué dans le développement de l'hyperplasie, cause de l'hyper-développement musculaire des individus TT. Quant à l' $\alpha$ -1-antitrypsine elle est sous-exprimée dans l'ensemble des muscles TT. Trois spots de protéines ont été également mis en évidence pour l'A1AT, un dans le TL, un dans les trois autres muscles et un dans l'analyse combinée de tous les muscles. Son action au niveau du muscle n'est pas encore bien élucidée, toutefois elle pourrait jouer un rôle dans les phénomènes protéolytiques en inhibant certaines sérine-protéases musculaires, mais le point le plus intéressant est sa capacité à inhiber la fixation de la transferrine sur son récepteur cellulaire décrite par Graziadei *et al.* (1998) [97]. La sous-expression de l' $\alpha$ -1-antitrypsine dans les muscles des individus TT pourrait se combiner à la surexpression de transferrine et amplifier son action proliférative favorisant ainsi le développement de l'hyperplasie.

Pour étudier plus avant ces protéines, nous avons voulu suivre l'expression de leurs ARNm chez le fœtus lors de la mise en place du muscle, et dans deux muscles types le SM et le VM. La transferrine et l'A1AT ne sont présentes qu'en une seule copie génique. Nous n'avons pas observé de différence d'expression des ARNm de la transferrine ni de l' $\alpha$ -1-antitrypsine suggérant que la régulation de l'expression de ces protéines dans le muscle est associée à des phénomènes post-transcriptionnels. Nous avons également étudié l'expression des ARNm de la myostatine, nous n'avons pas encore confirmation de la mutation décrite par Clop *et al.* [2] et son gène était un candidat très séduisant aux vues des similitudes de phénotype avec les bovins hyper-développés et mutés pour ce gène. De plus, nous avons mis en évidence une sous-expression du gène de la myostatine dans le VM et le SM des agneaux TT âgés de trois mois, confirmée par une tendance à la sous-expression du gène de la myostatine dans les fœtus TT. Ce qui est en accord avec le mécanisme de la mutation décrit par Clop *et al.* [2] faisant intervenir une mutation dans la région 3'UTR de l'ARNm (Untranslated Region, extrémité non traduite de l'ARNm comportant des séquences régulatrices). Cette mutation conduit à la reconnaissance de la séquence mutée par des miARN exprimés dans le muscle, entraînant la dégradation de ce complexe ARN double brin dans le sarcoplasme et donc une diminution des ARNm de la myostatine. Cette inhibition de l'expression de la myostatine est dépendante de l'expression des miARN, en l'absence de ces derniers la myostatine peut être exprimée normalement. Les miARN étant spécifiquement exprimés dans le muscle [2] les autres tissus ne présenteront pas de déficience. En plus d'une expression spatio-spécifique (tissus particuliers) les miARN présentent souvent des variations d'expression au cours du temps; il faudrait analyser en détail l'expression des miARN ciblant la myostatine pour déterminer les effets de la mutation sur les muscles.

Il est apparu que la myostatine, la transferrine et l' $\alpha$ -1-antitrypsine étaient très exprimées au stade fœtal, laissant supposer, pour ces gènes, un rôle important dans le développement musculaire. Nous avons également détecté une expression plus forte des ARNm de la myostatine dans le SM par rapport au VM des individus RR. On peut dès lors imaginer que l'influence de l'absence de myostatine sera plus forte sur le développement du SM que sur celui du VM. Ainsi le VM pourrait ne pas être très affecté, alors que dans le SM se met en place un phénotype hyper-développé. Cependant le VM est un muscle de l'intérieur de la cuisse il n'a pas la possibilité de se développer vers l'extérieur comme le SM. Son faible développement pourrait donc résulter d'un phénomène de contraintes spatiales : il ne se développe pas car il n'en a pas la place. Pour pouvoir trancher il faudrait étudier l'expression de la myostatine dans d'autres muscles présentant différents degrés d'hyperdéveloppement et localisé sur différentes régions de la musculature. Par ailleurs ces deux mécanismes (contraintes spatiales et différence d'expression du gène) ne sont pas mutuellement exclusifs.

L'étude du protéome du modèle hyperdéveloppé Texel a permis de mettre en évidence différentes protéines, donc des gènes susceptibles d'être impliqués dans les mécanismes du développement musculaire. Il serait intéressant d'étudier leurs cinétiques d'expression à des stades clefs depuis la vie fœtale jusqu'aux stades adultes et ceci en interaction avec l'expression des miARN et de la myostatine. Dans cette étude, des modèles musculaires n'exprimant pas l'hypertrophie, tel le VM, devraient apporter des informations intéressantes pour la compréhension des mécanismes.

**Références,  
Présentations  
&  
Lexique**

# REFERENCES

1. Marcq, F., C. Larzul, V. Marot, J. Bouix, F. Eychenne, E. Laville, B. Bibé, P. Leroy, M. Georges & J.M. Elsen. (2002) Preliminary results of a whole-genome scan targeting QTL for carcass traits in Texel x intercross. In: *Proc. 7th World Cong. On Genetic Appl. Livest.* Montpellier, France. pp 323-326
2. Clop, A., F. Marcq, H. Hakeda, D. Pirottin, J. Tobin, B. Bibé, J. Bouix, F. Caiment, J.M. Elsen, F. Eychenne, C. Larzul, E. Laville, F. Meish, D. Milenkovic, X. Tordoir, C. Charlier & M. Georges. (2006) A mutation revealing an illegitimate miRNA target site in the myostatin gene is a QTN with major effect on muscularity in Texel sheep. *Nature genetics.* (on-line).
3. Yan, J. X., R. A. Harry, R. Wait, S. Y. Welson, P. W. Emery, V. R. Preedy & M. J. Dunn. (2001) Separation and identification of rat skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics.* **1**, 424-43
4. Mauro, A. (1961) Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* **9**, 493-495.
5. Beauchamp, J.R., L. Heslop, D.S. Yu, S. Tajbakhsh, R.G. Kelly, A. Wernig, M.E. Buckingham, T.A. Partridge & P.S. Zammit. (2000) Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cell. *J Cell Biol.* **151**, 1221-1234.
6. Grounds, M.D. (1991) Towards understanding skeletal muscle regeneration. *Pathol. Res. Pract.* **187**, 1-22.
7. Hurme, T. & H. Kalimo. (1992) Activation of myogenic precursor cells after muscle injury. *Med Sci Sports Exerc.* **24**(2), 197-205.
8. Ralston, E., Z. Lu & T. Ploug. (1999) The organization of the golgi complex and microtubules in skeletal muscle is fiber type-dependent. *J. Neuroscience.* **19**(24), 10694-10705.
9. Rahkila, P., K. Vaananen, J. Saraste & K. Metsikko. (1997) Endoplasmic reticulum to Golgi trafficking in multinucleated skeletal muscle fibers. *Exp Cell Res.* **234**(2), 452-64.
10. Kaisto, T. & K. Metsikko. (2003) Distribution of the endoplasmic reticulum and its relationship with the sarcoplasmic reticulum in skeletal myofibers. *Exp Cell Res.* **289**(1), 47-57.
11. [www.vulgaris-medical.com](http://www.vulgaris-medical.com)
12. Wegner, A. (1979) Equilibrium of the actin-tropomyosin interaction. *J Mol Biol.* **131**, 839-853.
13. Ebashi, S. & A. Kodoma. (1966) Interaction of troponin with F-actin in the presence of tropomyosin. *J Biochem.* (Tokyo) **59**, 425-426.
14. Babcock, G.G. & V.M. Fowler. (1994) Isoform-specific interaction of tropomodulin with skeletal muscle and erythrocyte tropomyosins. *J Biol Chem.* **269**, 27510-27518.
15. Hug, C., T.M. Miller, M.A. Torres, J.F. Casella, & J.A. Cooper. (1992) identification and characterization of an actin-binding site of CapZ. *J Cell Biol.* **116**, 923-931.
16. Okagaki, T., F.E. Weber, D.A. Fischman, K.T. Vaughan, T. Mikawa & F.C. Reinach. (1993) the major myosin-binding domain of skeletal muscle MyBP-C (C protein) resides in the COOHterminal, immunoglobulin C2 motif. *J Cell Biol.* **123**, 619-626.
17. Takano-Ohmuro, H., S.M. Goldfine, T. Kojima, T. Obinata & D.A. Fischman. (1989) Size and Charge heterogeneity of C-protein isoforms in avian skeletal muscle. Expression of six different isoforms in chicken muscle. *J Muscle Res Cell motil.* **10**, 369-378.
18. Rundell, K.W., P.C. Tullson & R.L. Terjung. (1992) Altered kinetics of AMP deaminase by myosin binding. *Am J Physiol.* **263**, C294-299.
19. Huxley, H. E. & J. Hanson. (1954) Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature.* **173**, 973-976.
20. Vale, R.D. & R.A. Milligan. (2000) The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science.* **288**, 88-95.

21. Labeit, S. & B. Kolmerer. (1995) Titins: Giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science* **270**, 293-296. Lin, Y.J., Seroude, L., and Benzer, S. (1998) Extended lifespan and stress resistance in the *Drosophila* mutant methuselah. *Science*. **282**, 943-946.
22. Millevoi, S., K. Trombitas, B. Kolmerer, S. Kostin, J. Schaper, K. Pelin, H. Granzier, & S. Labeit. (1998) Characterization of nebulin and nebulin and emerging concepts of their role of vertebrate Z-discs. *J Mol Biol.* **282**, 111-123.
23. McElhinny, A.S., B. Kolmerer, V.M. Fowler, S. Labeit & C.C. Gregorio. (2001) The N-terminal end of nebulin interacts with tropomodulin at the pointed end of the thin filaments. *J Biol Chem.* **276**, 583-592.
24. Wang, K. (1996) Titin/connectin and nebulin: giant protein rulers of muscle structure and function. *Adv Biophys.* **33**, 123-134.
25. Kruger, M., J. Wright & K. Wang. (1991) Nebulin as a length regulator of thin filaments of vertebrate skeletal muscles: correlation of thin filament length, nebulin size and epitope profile. *J Cell Biol.* **115**, 97-107.
26. Clark, K.A., A.S. McElhinny, M.C. Beckerle & C.C. Gregorio. (2002) Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **18**, 637-706.
27. Chin, E.R. & D.G. Allen. (1996) The role of elevations in intracellular. *J Physiol.* **491**, 813-24.
28. Huber, B. & D. Pette. (1996) Dynamics of parvalbumin expression in low-frequency-stimulated fast-twitch rat muscle. *Eur J Biochem.* **236**(3), 814-819.
29. Chance, B., H. Sies & A. Boveris. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* **59**(3), 527-605.
30. Kalous, M. & Z. Drahota. (1996) The role of mitochondria in aging. *Physiol Res.* **45**(5), 351-9.
31. Sastre, J., *et al.* (2000) Mitochondria, oxidative stress and aging. *Free Radic Res.* **32**(3), 189-198.
32. Shigenaga, M.K., T.M. Hagen & B.N. Ames. (1994) Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**(23), 10771-10778.
33. Turrens, J.F. (1997) Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep.* **17**(1), 3-8.
34. Giulivi, C., J.J. Poderoso & A. Boveris. (1998) Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem.* **273**(18), 11038-11043.
35. Thornalley, P.J. (1996) Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification -- a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen Pharmacol.* **27**(4), 565-573.
36. Yu, B.P. (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* **74**(1), 139-62.
37. Ames, B.N., L.S. Gold & W.C. Willett. (1995) The causes and prevention of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**(12), 5258-5265.
38. Serbecic, N. & S.C. Beutelspacher. (2005) Anti-oxidative vitamins prevent lipid-peroxidation and apoptosis in corneal endothelial cells. *Cell Tissue Res.*
39. Morrow, G., *et al.* (2004) Overexpression of the small mitochondrial Hsp22 extends *Drosophila* life span and increases resistance to oxidative stress. *Faseb J.* **18**(3), 598-599.
40. Liaw, S.H., J.J. Villafranca & D. Eisenberg. (1993) A model for oxidative modification of glutamine synthetase, based on crystal structures of mutant H269N and the oxidized enzyme. *Biochemistry.* **32**(31), 7999-8003.
41. Fisher, M.T. & E.R. Stadtman. (1992) Oxidative modification of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Decreases in the thermodynamic stability of protein structure and specific changes in the active site conformation. *J Biol Chem.* **267**(3), 1872-1880.
42. Friguet, B., L.I. Szewda & E.R. Stadtman. (1994) Susceptibility of glucose-6-phosphate dehydrogenase modified by 4-hydroxy-2-nonenal and metal-catalyzed oxidation to proteolysis by the multicatalytic protease. *Arch Biochem Biophys.* **311**(1), 168-173.

43. Coux, O., K. Tanaka & A.L. Goldberg. (1996) Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem.* **65**, 801-847.
44. Wang, N., *et al.* (1993) A human mitochondrial ATP-dependent protease that is highly homologous to bacterial Lon protease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**(23), 11247-11251.
45. Marcillat, O., *et al.*, Mitochondria contain a proteolytic system which can recognize and degrade oxidatively-denatured proteins. *Biochem J*, 1988. **254**(3), 677-683.
46. Bota, D.A. & K.J. Davies. (2002) Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism. *Nat Cell Biol.* **4**(9), 674-680.
47. Suzuki, C.K., *et al.* (1997) ATP-dependent proteases that also chaperone protein biogenesis. *Trends Biochem Sci.* **22**(4), 118-123.
48. Peinado, B., R. Latorre, J.M. Vaquez-Auton, A. Poto, G. Ramirez, O. Lopez-Albors, F. Moreno & F. Gil. (2004) Histochemical skeletal muscle fibre types in the sheep. *Anat Histol Embryol.* **33**(4), 236-243.
49. Suzuki A. (1971) Histochemical classification of individual skeletal muscle fibres in the sheep. I. On M. *semitendinosus*, M. *longissimus dorsi*, M. *psaos major*, M. *latissimus dorsi* and M. *gastrocnemius*. *Jpn J Zootech Sci.* **42**, 39-47.
50. Sayd T., T. Méra, V. Martin & E. Laville. (1998) Spatial distribution of myosin heavy chain isoforms and lactate deshydrogenase M4 in the limb musculature of two crossbred lambs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B.* **120**, 153-163
51. Hamelin, M., T. Sayd, C. Chambon, J. Bouix, B. Bibé, D. Milenkovic, H. Levéziel, M. Georges, A. Clop, P. Marinova & E. Laville. (2006) Proteomic analysis of the ovine "Belgian Texel" breed muscle hypertrophy. *J Anim Sci (accepté)*.
52. Wigmore, P.M., & D.J. Evans. (2002) Molecular and cellular mechanisms involved in the generation of fiber diversity during myogenesis. *Int Rev Cytol.* **216**, 175-232.
53. Stäl, P., P.O. Eriksson, S. Schiaffino, G.S. Butler-Browne and L.E. Thornell. (1994) Differences in myosin composition between human oro-facial, masticatory and limb muscles: enzyme-, immunohisto- and biochemical studies. *J Muscle Res Cell Motil.* **15**(5), 517-534.
54. LeFaucheur, L. (2003) Typologie et ontogenèse des fibres musculaires chez le porc. *INRA Prod Anim.* **16**, 133-136.
55. Cossu, G., & U. Borello. (1999) Wnt signaling and the activation of myogenesis in mammals. *EMBO J.* **18**(24), 6867-6872.
56. Perry, R.L., M.H. Parker & M.A. Rudnicki. (2001) Activated MEK1 binds the nuclear MyoD transcriptional complex to repress transactivation. *Mol Cell.* **8**(2), 291-301.
57. Koochmaraie, M., S.D. Shackelford, T.L. Wheeler, S.M. Lonergan & M.E. Doumit. (1995) A muscle hypertrophy condition in lamb (callipyge): characterization of effects on muscle growth and meat quality traits. *J Anim Sci.* **73**(12), 3596-3607.
58. Cockett, N. E., S.P. Jackson, T.L. Shay, F. Farnir, S. Berghmans, G.D. Snowder, D.M. Nielsen, & M. Georges. (1996) Polar overdominance at the ovine callipyge locus. *Science.* Jul 12; 273(5272):236-8.
59. Cockett, N. E., M.A. Smit, C.A. Bidwell, K. Segers, T.L. Hadfield, G.D. Snowder, M. Georges, & C. Charlier. (2005) The callipyge mutation and other genes that affect muscle hypertrophy in sheep. *Genet Sel Evol.* **37** Suppl 1, S65-81.
60. Georges, M., C. Charlier, & N. Cockett. (2003) The callipyge locus: evidence for the trans interaction of reciprocally imprinted genes. *Trends Genet.* **19**(5), 248-252.
61. Laville, E., J. Bouix, T. Sayd, B. Bibé, J. M. Elsen, C. Larzul, F. Eychenne, F. Marcq & M. Georges. (2004) Effects of a quantitative trait locus for muscle hypertrophy from Belgian Texel sheep on carcass conformation and muscularity. *J. Anim. Sci.* **82**, 3128-3137.
62. Kambadur, R., M. Sharma, T.P. Smith & J.J. Bass. (1997) Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscléd Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res.* **7**(9), 910-916.

63. Oldham, J.M., J.A. Martyn, M. Sharma, F. Jeanplong, R. Kambadur & J.J. Bass. (2001) Molecular expression of myostatin and MyoD is greater in double-muscléd than normal-muscléd cattle fetuses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **280**(5), R1488-93.
64. Grobet, L., D. Poncelet, L.J. Royo, B. Brouwers, D. Pirottin, C. Michaux, F. Menissier, M. Zanotti, S. Dunner & M. Georges. (1998) Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. *Mamm Genome.* **9**(3), 210-213.
65. Grobet, L., L.J. Martin, D. Poncelet, D. Pirottin, B. Brouwers, J. Riquet, A. Schoeberlein, S. Dunner, F. Menissier, J. Massabanda, R. Fries, R. Hanset & M. Georges. (1997) A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscléd phenotype in cattle. *Nat Genet.* **17**(1), 71-74.
66. Bellinge, R.H., D.A. Liberles, S.P. Iaschi, P.A. O'brien & G.K. Tay. (2005) Myostatin and its implications on animal breeding: a review. *Anim Genet.* **36**(1), 1-6.
67. Yamanouchi, K., C. Soeta, K. Naito & H. Tojo. (2000) Expression of myostatin gene in regenerating skeletal muscle of the rat and its localization. *Biochem Biophys Res Commun.* **270**(2), 510-516.
68. Artaza, J.N., S. Bhasin, C. Mallidis, W. Taylor, K. Ma & N.F. Gonzalez-Cadavid. (2002) Endogenous expression and localization of myostatin and its relation to myosin heavy chain distribution in C2C12 skeletal muscle cells. *J Cell Physiol.* **190**(2), 170-179.
69. Bass, J., J. Oldham, M. Sharma, & R. Kambadur. (1999) Growth factors controlling muscle development. *Domest Anim Endocrinol.* **17**(2-3), 191-197.
70. Deveaux, V., B. Picard, J. Bouley & I. Cassar-Malek. (2003) Location of myostatin expression during bovine myogenesis in vivo and in vitro. *Reprod Nutr Dev.* **43**(6), 527-542.
71. Liu, D., B.L. Black & R. Derynck. (2001) TGF-beta inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. *Genes Dev.* **15**(22), 2950-2966.
72. Langley, B., M. Thomas, A. Bishop, M. Sharma, S. Gilmour & R. Kambadur. (2002) Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J Biol Chem.* **277**(51), 49831-49840.
73. Thomas, M., B. Langley, C. Berry, M. Sharma, S. Kirk, J. Bass & R. Kambadur. (2000) Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem.* **275**(51), 40235-40243.
74. Lee, S.J. & A.C. McPherron. (2001) Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**(16), 9306-9311.
75. Lee, S.J. & A.C. McPherron. (1999) Myostatin and the control of skeletal muscle mass. *Curr Opin Genet Dev.* **9**(5), 604-607.
76. Huber, L.A., K. Pfaller & I. Vietor. (2003) Organelle proteomics: implications for subcellular fractionation in proteomics. *Circ Res.* **92**(9):962-968.
77. Stasyk, T. & L.A. Huber. (2004) Zooming in: fractionation strategies in proteomics. *Proteomics.* **4**(12):3704-3716.
78. Pietrzak, M., M. L. Greaser & A. A. Sosnicki. (1997). Effect of rapid rigor mortis processes on protein functionality in *pectoralis major* muscle of domestic turkeys. *J. Anim. Sci.* **75**, 2106-2116.
79. Moody, D., Z. Zou & L. McIntyre. (2002) Cross-species hybridisation of pig RNA to human nylon microarrays. *BMC Genomics.* **3**(1), 27.
80. Sayd, T., M. Morzel, C. Chambon, M. Franck, P. Figwer, C. Larzul, P. Le Roy, G. Monin, P. Chérel & E. Laville. (2006) Proteome analysis of the sarcoplasmic fraction of pig *semimembranosus* muscle: implications on meat colour development. *J. of Agricultural & food Chem (In press).* **54**, 2732-2737
81. Brooke, M.H. & K. K. Kaiser. (1970). Three 'myosin adenosine triphosphatase' systems: the nature of their lability and sulfhydryl dependence. *J. Histochem. Cytochem.* **18**:670-2.

82. Nachals, M.M., K. Tsou, E. DeSousa, C. Chang & A.M. Seligman. (1957). Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. *J. Histochem. Cytochem.* **5**:420-36.
83. Yan, J.X., R. Wait, T. Berkelman, R. A. Harry, J. A. Westbrook, C. H. Wheeler & M. J. Dunn. (2000) A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis.* **21**, 3666-72.
84. Monin, G. & A. Ouali. (1991) Muscle differentiation and meat quality. *Development in Meat Science* London (Elsevier Applied Science). **5**, 89-157.
85. Armstrong, R.B. & R.O. Phelps. (1984) Muscle fibre type composition of the rat hindlimb. *A J Anat.* **171**, 259-272.
86. Solomon, M.B., W.G. Moody, D.J. Kemp & D.J. Ely. (1981) Effect of breed, slaughter weight and sex on histochemical properties of ovine muscle. *J. Anim. Sci.* **52**, 1019-1025.
87. Fry, A.C., C.A. Allemeier & R.S. Staron. (1994) Correlation between percentage fibre type area and myosin heavy chain content in human skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol.* **68**, 246-241.
88. Brooke, M.H. & K.K. Kaiser. (1970) Three 'myosin adenosine triphosphatase' systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. *J. Histochem. Cytochem.* **18**, 670-672.
89. Schiaffino, S. & C. Reggiani. (1994) Myosin in mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol.* **77**, 493-501.
90. Kim, N.K., J.H. Joh, H.R. Park, O.H. Kim, B.Y. Park & C.S. Lee. (2004) Differential expression profiling of the proteomes and their RNAs in porcine white and red skeletal muscles. *Proteomics.* **4**, 3422-3428.
91. Okumura, N., A. Hashida-Okumura, K. Kita, M. Matsubae, T. Matsubara, T. Takao, K. Nagai. (2005) Proteomic analysis of slow- and fast-twitch skeletal muscles. *Proteomics.* **5**, 2896-2905.
92. Ménéssier, F. (1980) General survey of the effect of double muscling on cattle performance. In: *16<sup>th</sup> ed. Muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef production.* King J.W.B. & Ménéssier F. Ed. M. Nijhoff, The Hague, The Netherlands. Page 23.
93. Dumont, B.L. (1980) Carcass composition and muscle hypertrophied animals. In: *16<sup>th</sup> ed. Muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef production.* King J.W.B. & Ménéssier F. Ed. M. Nijhoff, The Hague, The Netherlands. Page 111.
94. Bouley, J., B. Meunier, C. Chambon, S. De Smet, J. F. Hocquette & B. Picard. (2005) Proteomic analysis of bovine skeletal muscle hypertrophy. *Proteomics.* **5**, 490-500.
95. Ozawa, E. (1989) Transferrin as a muscle trophic factor. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* **113**, 89-141.
96. Graziadei, I. (1998) The acute-phase protein alpha1-antitrypsin inhibits transferrin-receptor binding and proliferation of human skin fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1401**, 170-176.
97. Meek, J. & E.D. Adamson. (1985) Transferrin in foetal and adult mouse tissues: synthesis, storage and secretion. *J Embryol Exp Morphol.* **86**, 205-18.
98. Bloomer, R.J. & A.H. Goldfarb. (2004) Anaerobic exercise and oxidative stress: a review. *Can J Appl Physiol.* **29**(3), 245-263.
99. Seibert, V., A. Wiesner, T. Buschmann and J. Meuer. (2004) Surface enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) and ProteinChip® technology in proteomics search. *Pathology research and practice.* **200**, 83-94.
100. Cleveland, D.W., M.A. Lopata, P. Sherline & M.W. Kirschner. (1981) Unpolymerized tubulin modulates the level of tubulin mRNAs. *Cell.* **25**(2), 537-546.
101. Caron, J.M., A.L. Jones & M.W. Kirschner. (1985) Autoregulation of tubulin synthesis in hepatocytes and fibroblasts. *J Cell Biol.* **101**, 1763-1772.

102. Chen, G., S. Carroll, P. Racay, J. Dick, D. Pette, I. Traub, G. Vrbova, P. Eggli, M. Celio & B. Schwaller. (2001) Deficiency in parvalbumin increases fatigue resistance in fast-twitch muscle and upregulates mitochondria. *Am J Physiol Cell Physiol.* **281**(1), C114-122.
103. Glatz, J.F., F.G. Schaap, B. Binas, A. Bonen, G.J. van der Vusse & J.J. Luiken. (2003) Cytoplasmic fatty acid-binding protein facilitates fatty acid utilization by skeletal muscle. *Acta Physiol Scand.* **178**(4), 367-371.
104. Campbell, S.E. & M.A. Febbraio. (2001) Effects of ovarian hormones on exercise metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* **4**(6), 515-520.

## Publications & Présentations

**M. Hamelin**, C. Chambon, T. Sayd, D. Milenkovic, H. Leveziel, J. Bouix, B. Bibé, M. Georges, A. Clop, E. Laville. *Differential expression of sarcoplasmic proteins in four heterogeneous ovine skeletal muscle. (Protéomics)*. 2006.

**M. Hamelin**, C. Chambon, T. Sayd, D. Milenkovic, H. Leveziel, J. Bouix, B. Bibé, M. Georges, A. Clop, E. Laville. *Proteomic analysis of the ovine "Belgian Texel" breed muscle hypertrophy. (JAS)*. 2006.

Poster: E. Laville, **M. Hamelin**, H. Leveziel, D. Milenkovic, J. Bouix, M. Georges, A. Clop, D. Grasset. Identification du gène et des mécanismes responsables de l'hypertrophie musculaire dans la race ovine "Texel Belge". *Séminaire Génanimal*, Saint-Malo 2006.

Com. Orale : **M. Hamelin**, L. Forestier, D. Milenkovic, E. Laville. Expression génique dans le muscle semimembranosus d'ovins porteurs de la mutation "Texel Belge". *Congrès JSMTV*, Clermont-ferrand 2006.

Poster: **M. Hamelin**, T. Sayd, C. Chambon, J. Bouix, B. Bibé, A. Clop, M. Georges, D. Milenkovic, H. Leveziel, E. Laville. Ovine Muscular Hypertrophy: a Proteomic Study. *Rencontres Recherches Ruminants*, Paris 2005.

Poster: D. Milenkovic, V. Amarger, L. Forestier, A. Maftah, H. Leveziel, E. Laville, **M. Hamelin**, J. Bouix, B. Bibé, M. Georges, A. Clop. Identification de gènes candidats et des mécanismes responsables de l'hypertrophie musculaire dans la race ovine "Texel Belge". *Rencontres Recherches Ruminants*, Paris 2005.

Poster: **M. Hamelin**, C. Chambon, T. Sayd, J. Bouix, B. Bibé, A. Clop, M. Georges, D. Milenkovic, H. Leveziel, P. Marinova, E. Laville. Ovine double-muscling: muscle structure & protein pattern. *52th International Congress of Meat Science & Technology*, Baltimore 2005.

Poster: D. Milenkovic, V. Amarger, L. Forestier, M. Gillard, A. Maftah, E. Laville, **M. Hamelin**, J. Bouix, B. Bibé, M. Georges, A. Clop, H. Leveziel. Identification de gènes candidats et des mécanismes responsables de l'hypertrophie musculaire dans la race ovine "texel Belge". *AGENAE*, Saint-Malo 2004.

Poster: **M. Hamelin**, T. Sayd, C. Chambon, P. Marinova, G. Monin, E. Laville. Analyse des Proteines Sarcoplasmiques du Muscle Hypertrophié de Mouton. *Congrès SFEAP*, Bordeaux 2004.

Poster: T. Sayd, **M. Hamelin**, C. Bouchut, M. Morzel, and E. Laville. Sous-fractionnement et séparation par électrophorèse 2D des protéines musculaires. *Congrès SFEAP*, Bordeaux 2004.

Com. Orale: **M. Hamelin**, T. Sayd, C. Chambon, G. Monin, E. Laville. Protéines Sarcoplasmiques et Caractérisation Protéomique des Types Musculaires Ovin. *Congrès JSMTV*, Rennes 2004.

Morzel M, Chambon C, **Hamelin M**, Santé-Lhoutellier V, Sayd T, Monin G. Proteome changes during pork meat ageing following use of two different pre-slaughter handling procedures. *Meat Science* 2003.

Baudry D, **Hamelin M**, Cabanis M-O, Fournet J-C, Tournade M-F, Sarnacki S, Junien C and Jeanpierre C. WT1 splicing alterations in Wilms' tumors. *Clinical Cancer Research* 2000, **6**:3957-3965.

## LEXIQUE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

20 $\alpha$ -HSD: 20 $\alpha$ -Hydroxystéroïde Déshydrogénase	MALDI- SELDI-TOF: Matrix Assisted and Surface
A1AT: alpha-1-antitrypsine, $\alpha$ -1-antitrypsine	Enhanced Laser desorption/ionisation Time of Flight
ACN: Acétonitrile	MHC, MLC: Myosin Heavy and Light Chain, chaînes de myosine
ADN, DNA: acide déoxyribonucléique	MSTN, GDF-8: Myostatine
ADNc, cDNA: ADN complémentaire	Mw: Masse moléculaire
ADP: Adénosine Diphosphate	NAD <sup>+</sup> , NADH, FAD <sup>+</sup> , FADH <sub>2</sub> , FMNH <sub>2</sub> , NADP <sup>+</sup> , NADPH: Cofacteurs des réactions d'oxydo-réduction
AMP: Adénosine Monophosphate	PCR: Polymerase chain reaction
ARN, RNA: Acide ribonucléique	Pi: Phosphate inorganique
ARNm, mRNA: ARN messenger	pI: Point isoélectrique de la protéine
ATP: Adénosine Triphosphate	QTL: Quantitative trait Locus, région chromosomique associée à un phénotype
Conc: concentration protéique	RR, TT: Génotypes homozygotes au locus Texel
Da, kDa: unité de masse, Dalton et kiloDalton	RT-PCR: réverse transcription suivi d'une PCR
DM: double musclé	SDS-PAGE: électrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide.
DO260/280: rapport des Densités optiques à 260 et 280nm.	SM: Semimembranosus
Electrophorèse 2-D: Electrophorèse bidimensionnelle	SNP: Single nucleotid polymorphism
ERA: Espèces réactives de l'azote	SOD: Superoxyde dismutase
ERO: Espèces réactives de l'oxygène	SS: Supraspinatus
FABP: Fatty acid binding protein	SSP: code de numéro de spot dans le logiciel
GAPDH: Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase	PDQuest (Biorad)
GDP: Glutamine Diphosphate	SYBRgreen: marqueur fluorescent de l'ADN double brin
GPX: Glutathion Peroxydase	Tf: Transferrine
GSH: Glutathion	TGF: Tumor Growth Factor
GST: Glutathion S-Transférase	TL: Tensor fasciae latae
GTP: Glutamine Triphosphate.	UTR: Région non traduite de l'ARN
HSCoA: Acétyl Coenzyme A	VM: Vastus medialis
HSP: protéines de choc thermique (Heat Shock Protein)	
ID: identité de la protéine	
IEF: Iso-électro-focalisation	
LD: Longissimus dorsi	

# ANNEXE I

Données de l'étude du protéome:

- Animaux
- Muscles
- Extraction protéique 2D / SELDI
- Identification en spectrométrie  
de Masse

Analyse électrophorèse bidimensionnelle							
n°agneau	n°	sexe	Génotype	protéine concentration (g/L)			
				TL	SM	LD	VM
30163	27	mâle	RR	2.52	2.52	3.15	--
30299	32	femelle	RR	2.92	2.43	3.43	3.14
30355	33	femelle	RR	3.21	2.70	3.55	2.80
30296	36	femelle	RR	3.38	2.05	3.35	3.28
30262	38	mâle	RR	2.62	2.69	3.26	2.56
20236	17	femelle	TT	3.25	2.53	3.39	--
20270	19	mâle	TT	3.43	2.67	3.30	--
30254	26	mâle	TT	3.00	2.72	3.15	2.83
30302	30	mâle	TT	2.86	2.26	3.28	2.86
30350	34	mâle	TT	2.55	2.25	3.33	2.45
30164	37	femelle	TT	--	--	--	3.02

Analyse SELDI sur le muscle SM				
n°agneau	n°	sexe	Génotype	Protéine concentration (g/L)
20308	16	mâle	RR	3.09
20306	20	mâle	RR	3.21
20241	22	mâle	RR	3.22
30163	27	mâle	RR	2.81
30255	28	mâle	RR	2.83
30349	29	mâle	RR	2.68
30087	31	mâle	RR	2.60
30262	38	mâle	RR	2.60
20263	6	mâle	TT	2.80
20330	9	mâle	TT	2.95
20265	14	mâle	TT	2.45
20234	18	mâle	TT	2.95
20270	19	mâle	TT	2.86
30254	26	mâle	TT	3.01
30302	30	mâle	TT	3.01
30350	34	mâle	TT	2.68

SSP	n° d'accession	ID	Mw kDa/ pI observé	Mw kDa/ pI théorique	espèce	% de couverture
5307R	gi 2201516/gi 265404	20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase	40,5 / 6,55	37,3 / 5,90	<i>Bos taurus</i>	53%
0710	gi 57526646	α-1-antitrypsine	60 / 4,9	46,0 / 5,83	<i>Ovis aries</i>	21%
1719R	gi 57526646	α-1-antitrypsine	60 / 5,1	46,0 / 5,83	<i>Ovis aries</i>	29%
1720R	gi 57526646	α-1-antitrypsine	60 / 5,0	46,0 / 5,83	<i>Ovis aries</i>	28%
2515R	gi 33563240	Actine, alpha 1, skeletal muscle	46 / 5,5	42,1 / 5,23	<i>Mus musculus</i>	26%
1509R	gi 71611	Actine, skeletal muscle	47 / 5,1	42,0 / 5,31	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	38%
5617R	gi 57526379	Aldehyde dehydrogenase	55 / 6,75	55,0 / 6,37	<i>Ovis aries</i>	36%
3619R	gi 25108887	Antiquitine 1	55 / 6,2	55,0 / 6,24	<i>Homo sapiens</i>	21%
3601R	gi 25108887	Antiquitine 1	55 / 5,8	55,0 / 6,24	<i>Homo sapiens</i>	22%
1606R	gi 1374715	ATP synthase F1, sous-unité beta	52 / 5,05	51,4 / 4,97	<i>Bos taurus</i>	38%
5204R	gi 61839453	Bisphosphoglycérate mutase	32 / 6,6	30,0 / 6,00	<i>Bos taurus</i>	41%
7206R	gi 68289	Carbonate déshydratase II	32 / 7,4	29 / 6,41	<i>Ovis aries</i>	50%
6224R	gi 6729828/gi 66920	Créatine Kinase Chain A/M, <b>fgt</b>	33 / 6,9	43,1-43,2 / 6,63	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	21%
7222R	gi 6729828/gi 66920	Créatine Kinase Chain A/M, <b>fgt</b>	33 / 7,0	43,0 / 6,63	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	28%
7530R	gi 4838363	Créatine Kinase M	46 / 7,25	43,0 / 6,63	<i>Bos taurus</i>	53%
7422R	gi 4838363	Créatine Kinase M	45 / 7,2	43,0 / 6,63	<i>Bos taurus</i>	22%
8317R	gi 4838363	Créatine Kinase M	35,5 / 7,6	43,0 / 6,63	<i>Bos taurus</i>	33%
7202R	gi 4838363	Créatine kinase M <b>fgt</b>	29 / 7,1	43,0 / 6,63	<i>Bos taurus</i>	27%
3111R	gi 27807489/gi 4838363	Créatine Kinase M <b>fgt</b>	17 / 6,0	43,0 / 6,63	<i>Bos taurus</i>	15%
6204R	gi 4838363	Créatine Kinase M <b>fgt</b>	29 / 6,9	43,0 / 6,63	<i>Bos taurus</i>	22%
7221R	gi 4838363	Créatine Kinase M <b>fgt</b>	29 / 7,3	43,0 / 6,63	<i>Bos taurus</i>	23%
3106R	gi 50513593/gi 59858513	DJ-1 protein	25 / 6,0	20,0 / 6,84	<i>Bos taurus</i>	47%
3614R	gi 23271834	Dlst protein, dihydrolipoamide S-succinyltransferase	53 / 6,15	22,0 / 6,43	<i>Mus musculus</i>	20%
5507R	gi 7331113 / gi 57086343	Enolase	47 / 6,6	47,3-55,4 / 6,44-8,41	<i>Ovis aries</i>	23%
4505R	gi 29792061	Enolase 1	49,5 / 6,25	47,2-47,3 / 6,44-7,01	<i>Homo sapiens</i>	18%
1408R	gi 27806645	Enolase 1	41,5 / 5,2	47,3 / 6,44	<i>Bos taurus</i>	45%
2404R	gi 27806645	Enolase 1	41,5 / 5,3	47,3 / 6,44	<i>Bos taurus</i>	41%
5418R	gi 57086343	Enolase 3	41 / 6,7	47,0 / 7,58	<i>Canis familiaris</i>	42%
7409R	gi 7331113	Enolase 3	45 / 7,3	47,0 / 7,58	<i>Ovis aries</i>	46%
6407R	gi 56206033/gi 57164373	Enolase 3	45 / 6,8	47,0 / 7,58	<i>Mus musculus</i>	31%
3202R	gi 57086343	Enolase 3 <b>fgt</b>	27 / 5,6	47,0 / 7,58	<i>Canis familiaris</i>	21% (70% seq <i>O. aries</i> )
6607R	gi 57086919/gi 27806645	Enolase alpha	50 / 6,9	47,0 / 6,44	<i>Canis familiaris</i>	23%
2007	Q8HY78/ gi 26000692	FABP-H	11,5 / 5,5	15,0 / 6,11	<i>Ovis aries</i>	49%
3002R	Q8HY78/ gi 26000691	FABP-H	11,5 / 6,0	15,0 / 6,11	<i>Ovis aries</i>	35%
6307R	gi 2154755	Fructose-1,6-bisphosphatase 2	39 / 7,0	37,0 / 6,84	<i>Homo sapiens</i>	13%
7118R	gi 6013379	Glutathione S-transferase Pi	24 / 7,3	23,6 / 7,65	<i>Capra hircus</i>	44%
7220R	gi 404	Glutathione S-transferase Pi	27 / 7,2	24,0 / 6,89	<i>Bos taurus</i>	48%
7118R	gi 6013379	Glutathione S-transferase Pi	22 / 7,5	24,0 / 7,65	<i>Capra hircus</i>	44%
6109R	gi 6013379	Glutathione S-transferase Pi	25 / 6,9	23,6 / 7,65	<i>Capra hircus</i>	63%

SSP	n° d'accession	ID	Mw kDa/ pI observé	Mw kDa/ pI théorique	espèce	% de couverture
6304R	gi 59857727	Glycerol-3-phosphate déshydrogenase 1	40 / 6,8	37,7 / 6,42	<i>Bos taurus</i>	25%
6308R	gi 59857727	Glycerol-3-phosphate déshydrogenase 1	40 / 7,0	37,7 / 6,42	<i>Bos taurus</i>	38%
5318	gi 2352268/gi 57163939	Glycogen phosphorylase <b>fgt</b>	35 / 6,6	97,3 / 6,65	<i>Ovis aries</i>	11% (Cter)
5225R	gi 2352268/gi 57163939	Glycogen phosphorylase <b>fgt</b>	35 / 6,65	97,3 / 6,65	<i>Ovis aries</i>	9% (Cter)
6203R	gi 2352268/gi 57163939	Glycogen phosphorylase <b>fgt</b>	35 / 6,9	97 / 6,65	<i>Ovis aries</i>	16% (Cter)
6207R	gi 2352268/gi 57163939	Glycogen phosphorylase <b>fgt</b>	35 / 7,0	97,3 / 6,65	<i>Ovis aries</i>	12% (Cter)
5305R	gi 14149777	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 2	35 / 6,6	28,5 / 5,84	<i>Homo sapiens</i>	41%
2801R	gi 56385	Hsc70-ps1	70 / 5,35	70,9 / 5,43	<i>Rattus norvegicus</i>	65%
1718R	gi 1334284	HSP 60	60 / 5,15	61,1 / 5,71	<i>Rattus norvegicus</i>	27%
5206R	gi 50979116/gi 61553385	HSP-27, heat shock protein 27kDa	29 / 6,7	23,0 / 6,0-6,2	<i>Bos taurus</i>	44%
2702R	gi 1334284	HSP-60, heat-shock protein 60kDa	60 / 5,4	61,0 / 5,71	<i>Rattus norvegicus</i>	27%
3633	gi 109029	Ig heavy chain C region	53 / 6,05	33,8 / 6,07	<i>Ovis aries</i>	36%
7129	gi 217590	Lactate déshydrogenase A <b>fgt</b>	15,5 / 7,15	33,8 / 8,17	<i>Bos taurus</i>	16%
6005R	gi 217590	Lactate déshydrogenase A <b>fgt</b>	13 / 6,9	37,0 / 8,44	<i>Ovis aries</i>	24%
4306R	gi 59858383	Lactate déshydrogenase B	40,5 / 6,5	36,7 / 6,02	<i>Bos taurus</i>	55%
6302R	gi 164543	Malate déshydrogenase	40 / 6,7	36,0 / 6,91	<i>Sus scrofa</i>	34%
5308R	gi 61856478	Malate déshydrogenase	40,5 / 6,6	33,0 / 6,2	<i>Bos taurus</i>	32%
7009R	gi 70563	Myoglobine	15 / 7,3	17,6 / 6,94	<i>Ovis aries</i>	51%
3208R	gi 1364245	NADH déhydrogenase 24 kDa subunit	29 / 6,1	23,5 / 5,71	<i>Bos taurus</i>	36%
1008R	gi 131103	Parvalbumin $\alpha$	12 / 4,9	12,0 / 4,98	<i>Ovis aries</i>	48%
5207R	gi 27807167/NP_777068	Peroxiredoxine 6, anti-oxidant protein 2	31 / 6,7	25,0 / 6,00	<i>Bos taurus</i>	73%
8706R	gi 538558	Phosphoglucomutase 1	63 / 7,7	61,6 / 6,58	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	18%
6706R	gi 31980726	Phosphoglucomutase 2	62 / 6,8	61,5 / 6,30	<i>Mus musculus</i>	31%
7702R	gi 1942567	Phosphoglucomutase Chain B	60 / 7,1	61,5 / 6,62	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	34%
4404R	gi 61873464	Phospho-Glycérate Kinase	42 / 6,2	44,6 / 8,02	<i>Bos taurus</i>	16%
3748	gi 57164373	prepro-Serum albumin ovine	55 / 5,8	69,2 / 5,80	<i>Ovis aries</i>	41%
2216R	gi 57164373	prepro-Serum albumin ovine	30 / 5,5	69,2 / 5,80	<i>Ovis aries</i>	22%
2605R	gi 57164373	prepro-Serum albumin ovine	54 / 5,5	69,2 / 5,80	<i>Ovis aries</i>	38%
2613R	gi 57164373	prepro-Serum albumin ovine	53 / 5,8	69,2 / 5,80	<i>Ovis aries</i>	22%
3611R	gi 57164373	prepro-Serum albumin ovine	55 / 5,95	69,2 / 5,80	<i>Ovis aries</i>	39%
5311R	gi 30582133	Proteasome, subunit alpha 1	36 / 6,8	30,2 / 6,51	<i>Homo sapiens</i>	42%
4206R	gi 38051889	Proteasome, subunit beta 7	34 / 6,3	29,9 / 8,13	<i>Rattus norvegicus</i>	31%
7617R	gi 1177221	Pyruvate Kinase	56 / 7,3	58,0 / 7,2-7,96	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	40%
4610R	gi 332864188/gi 33286422	Pyruvate kinase 3 isoform 1/2	50 / 6,3	58,0 / 7,2-7,96	<i>Homo sapiens</i>	20%
3310R	gi 478822/gi 31416989	Pyruvate Kinase 3 isoform 1/2 <b>fgt</b>	40,5/ 6,0	58,0 / 7,2-7,96	<i>Homo sapiens</i>	31%
4611R	gi 61867146	pyruvate kinase 3 isoform 2	50 / 6,3	58,0 / 7,2-7,96	<i>Bos taurus</i>	33%
5515R	gi 33286422	Pyruvate kinase 3 isoform 2 <b>fgt</b>	47 / 6,5	58,0 / 7,2-7,96	<i>Homo sapiens</i>	27%
5437R	gi 31416989	Pyruvate kinase 3, isoform 1 <b>fgt</b>	43 / 6,5	58,0 / 7,2-7,96	<i>Homo sapiens</i>	23%
8702R	gi 89089	Pyruvate kinase isoform M1	60 / 7,5	58,0 / 7,2-7,96	<i>Felis catus</i>	35%

SSP	n° d'accession	ID	Mw kDa/ pI observé	Mw kDa/ pI théorique	espèce	% de couverture
8609R	gi 2117873/gi 33286422	Pyruvate Kinase isoform M1	55 / 7,8	58,0 / 7,2-7,96	<i>Homo sapiens</i>	39%
3303R	gi 478822/gi 2117873/gi 31416989	Pyruvate kinase, isoform M2 <b>fgt</b>	40 / 5,9	58,0 / 7,2-7,96	<i>Homo sapiens</i>	23%
3710R	gi 14250361 / gi 33468931	Seryl-aminoacyl-tRNA synthetase 1	62 / 6,0	61,0 / 7,13	<i>Mus musculus</i>	33%
3107R	gi 627764	SP22 substrate protein of mitochondrial ATP-dependant proteinase	26 / 6,05	22,0 / 5,72	<i>Bos taurus</i>	22%
4202R	gi 627764	SP22 substrate protein of mitochondrial ATP-dependant proteinase	28 / 6,15	22,0 / 5,72	<i>Bos taurus</i>	37%
5701R	gi 13277819	Stress-induced phosphoprotein 1	63 / 6,45	63,0 / 6,40	<i>Mus musculus</i>	34%
5706R	gi 73983760	Stress-induced-phosphoprotein 1	62 / 6,55	63,0 / 6,40	<i>Canis familiaris</i>	23%
5704R	gi 284649	Succinate déshydrogenase (ubiquinone)	64 / 6,55	72,8 / 7,27	<i>Bos taurus</i>	20% (sur 80% seq)
5828R	gi 284649	Succinate déshydrogenase (ubiquinone)	62 / 6,65	72,8 / 7,27	<i>Bos taurus</i>	30%
5829R	gi 284648	Succinate déshydrogenase (ubiquinone)	62 / 6,7	72,8 / 7,27	<i>Bos taurus</i>	33%
3501R	gi 55957255/gi 55957259	Succinate-CoA ligase, beta subunit	46,5 / 5,8	48,0 / 6,65	<i>Homo sapiens</i>	31%
6803R	gi 29135265	Transferrine	75 / 6,9	77,75 / 6,75	<i>Bos taurus</i>	24%
6804R	gi 29135265	Transferrine	75 / 6,8	77,75 / 6,75	<i>Bos taurus</i>	24%
2106R	gi 59858493	Triose phosphate isomerase 1 <b>fgt</b>	20 / 5,5	26,7 / 6,45	<i>Bos taurus</i>	48%
6202R	gi 61888856	Triosephosphate isomerase	30 / 6,75	26,7 / 6,45	<i>Bos taurus</i>	39%
6205R	gi 59858493	Triosephosphate isomerase 1	30 / 6,87	26,7 / 6,45	<i>Bos taurus</i>	70%
6206R	gi 59858494	Triosephosphate isomerase 1	30 / 6,93	26,7 / 6,45	<i>Bos taurus</i>	82%
7218R	gi 59858493	Triosephosphate isomerase 1	30 / 7,2	26,7 / 6,45	<i>Bos taurus</i>	33%
8224R	gi 59858493	Triosephosphate isomerase 1	30 / 7,5	26,7 / 6,45	<i>Bos taurus</i>	33%
2611R	gi 27807137	Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I	50 / 6,7	53,0 / 5,94	<i>Bos taurus</i>	35%
7006R	gi 51701909	Ubiquitine	9 / 7,5	8,6 / 6,56	<i>Ovis aries</i>	19%
8107	A39608	$\alpha$ -crystalline, sous-unité beta	21 / 7,85	20,0 / 6,76	<i>Mus musculus</i>	32%

# ANNEXE II

Données de l'étude du transcriptome:

- Protocole d'extraction des ARN
- Protocole de Transcription inverse
- Animaux
- Concentrations des ARNm
- Quantités d'ARN utilisées

# Extraction d'ARN du muscle

## " RNeasy Midi protocole " de Qiagen®

- 1/ Mettre 150mg de tissu dans le tube-15mL d'homogénéisation avec 2mL de tampon RLT<sup>2</sup> et homogénéiser pendant 45 à 60 seconds.
- 2/ Ajouter 4mL d'eau distillée puis ajouter 65µL de solution Protéinase K<sup>3</sup> (Qiagen) et mélanger en pipetant.
- 3/ Incuber 20min à 55°C.
- 4/ Centrifuger pendant 5 minutes à 3000-5000g.
- 5/ Récupérer le surnageant, 6mL, dans un tube-15mL (attention au culot et au film qui peut se former sur la surface).
- 6/ Ajouter 0,5 volume d'éthanol 96-100%, environs 3mL, et bien mélanger.
- 7/ Transférer 3mL de la solution dans les midi-colonnes, placées sur des tubes de collection de 15mL.
- 8/ Centrifuger pendant 5 minutes à 3000-5000g puis jeter l'éluat.
- 9/ Répéter les étapes 6 et 7 deux fois, d'abord avec 3mL de la solution puis avec le reste de la solution (environs 3mL).
- 10/ Ajouter 2mL de tampon RW1 dans les colonnes.
- 11/ Centrifuger 5 min à 3000-5000g.
- 12/ Ajouter 20µL de DNase dans 140 µL de tampon RDD. Mélanger doucement et centrifuger si nécessaire pour regrouper toutes les gouttes.
- 13/ Ajouter ces 160µL sur les membranes des colonnes et laisser à température ambiante pendant 15 min.
- 14/ Ajouter 2 mL de tampon RW1 dans les colonnes et laisser à température ambiante 5 min.
- 15/ Centrifuger pendant 5 minutes à 3000-5000g pour laver les colonnes. Jeter l'éluat.
- 16/ Ajouter 4mL de tampon RW1 dans les colonnes.
- 17/ Centrifuger pendant 5 minutes à 3000-5000g pour laver les colonnes. Jeter l'éluat.
- 18/ Ajouter 2,5mL de tampon RPE dans les colonnes.
- 19/ Centrifuger pendant 2 minutes à 3000-5000g pour sécher les membranes des colonnes.
- 20/ Ajouter 2,5mL de tampon RPE dans les colonnes.
- 21/ Centrifuger pendant 5 minutes à 3000-5000g pour sécher les membranes des colonnes.
- 22/ Transférer les colonnes sur de nouveaux tubes de collection de 15 mL.
- 23/ Ajouter 250µL d'eau dans les colonnes puis laisser 1 minute à température ambiante.
- 24/ Centrifuger pendant 3 minutes à 3000-5000g.
- 25/ redéposer l'éluat sur la colonne (≈200µL), laisser 1 minute à température ambiante.

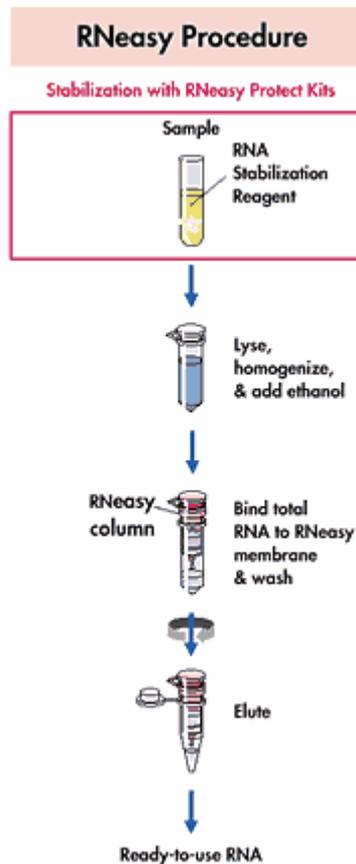
---

<sup>2</sup> Ajouter 10µL de β-mercaptoethanol dans 1mL de tampon RLT. La solution est stable 1 mois.

<sup>3</sup> Utiliser Qiagen proteinase K 600mU/ml, ou 20mg/mL d'un autre fournisseur.

26/ Centrifuger pendant 3 minutes à 3000-5000g.

27/ Transférer l'éluat dans un eppendorf 1,5mL stérile et stocker à -80°C.



## Transcription Inverse

Protocole "High capacity cDNA Archives kit" de Applied Biosystems®

1/ Dans un tube Eppendorf de 0,2mL mélanger 50µL d'ARN totaux à 10µL de Tampon RT 10X, 4µL d'oligonucléotides 1X (dNTP), 10µL d'amorces (hexamères aléatoires) 1X, et 5µL d'enzyme (reverse transcriptase) dans un volume final de 100µL.

2/ placer le tube à 42°C pendant 4h, stocker les ADNc ainsi obtenus à -20°C

	age	Génotype	brebis	n°	conc (µg/µL)	DO260/280	Qté Rétro- transcrite
	70 jrs	TT	30071	F1	0.1638	1.81	5 µg ARN
	70 jrs	TT	20669	F2	0.0477	1.93	2 µg ARN
	70 jrs	RT	20669	F3	0.1299	1.89	5 µg ARN
	70 jrs	TT	95066	F4	0.0970	1.87	2 µg ARN
	70 jrs	RT	960050	F5	0.0121	1.48	trop faible
	70 jrs	TT	20669	F6	0.0814	1.99	2 µg ARN
	70 jrs	TT	20327	F7	0.0518	1.87	2 µg ARN
	70 jrs	TT	30071	F8	0.1027	2.01	5 µg ARN
	70 jrs	TT	20293	F9	0.3143	1.92	2 µg ARN
	70 jrs	TT	20293	F10	0.1572	1.88	5 µg ARN
	70 jrs	RT	960780	F11	0.0925	1.83	2 µg ARN
	70 jrs	TT	960050	F12	0.2850	2.00	5 µg ARN
	70 jrs	RR	960813	F13	0.1092	1.96	5 µg ARN
	70 jrs	TT	95066	F14	0.1075	2.00	5 µg ARN
<b>Foetus</b>	90 jrs		20289	F15	0.0020	---	
	90 jrs		960799	F16	0.0397	1.38	
	90 jrs		40390	F17	0.0020	---	
	90 jrs		970528	F18	0.0061	0.43	
	90 jrs		30211	F19	0.0749	1.73	
	90 jrs		970528	F20	0.0350	1.41	
	90 jrs		40390	F21	0.0575	1.77	
	90 jrs		970542	F22	0.0000	---	
	90 jrs		30211	F23	0.0000	---	
	90 jrs		970542	F24	0.0000	---	
	90 jrs		30239	F25	0.0000	---	
	90 jrs		30239	F26	-0.0020	---	
	90 jrs		30061	F27	0.0172	1.89	trop faible
	90 jrs		30061	F28	0.0076	1.58	
	90 jrs		30211	F29	0.0056	1.53	
	50 jrs		970495	F30	0.3598	1.93	dégradé
	50 jrs		20252	F31	0.3034	1.90	dégradé
	50 jrs		30020	F32	0.1127	1.82	dégradé

	sexe	Génotype	agneau	n°	conc (µg/µL)	DO260/280	Qté Rétro- transcrite
	femelle	TT	20224	1	0.1418	1.87	5 µg ARN
	femelle	TT *	20237	2	0.1752	1.90	5 µg ARN
	femelle	RT *	20286	3	0.1194	1.82	5 µg ARN
	femelle	RT	20325	4	0.1333	1.56	5 µg ARN
	femelle	RR	20309	5	0.1265	1.84	5 µg ARN
	mâle	TT	20263	6	0.1148	1.88	5 µg ARN
	femelle	RR	20235	7	0.1007	1.96	5 µg ARN
	femelle	TT	20253	8	0.1382	1.88	5 µg ARN
	mâle	TT	20330	9	0.0857	1.90	2 µg ARN
	femelle	RR *	20285	10	0.1627	1.88	5 µg ARN
	femelle	RR	20279	11	0.0775	1.94	2 µg ARN
	mâle	RT *	20312	12	0.1379	1.88	5 µg ARN
	femelle	RT *	20315	13	0.1513	1.83	5 µg ARN
	mâle	TT *	20265	14	0.1383	1.72	5 µg ARN
<b>Semimembranosus</b>	femelle	RT *	20255	15	0.1894	1.98	5 µg ARN
	mâle	RR	20308	16	0.0537	1.80	2 µg ARN
	femelle	TT	20236	17	0.0876	1.89	2 µg ARN
	mâle	TT	20324	18	0.0870	1.73	2 µg ARN
	mâle	TT *	20270	19	0.1527	1.77	5 µg ARN
	mâle	RR	20306	20	0.1066	1.81	5 µg ARN
	femelle	RT *	20301	21	0.1652	1.89	5 µg ARN
	mâle	RR *	20241	22	0.2230	1.73	5 µg ARN
	mâle	TT	20266	23	0.2689	1.91	5 µg ARN
	mâle	TT *	30254	26	0.1504	1.76	5 µg ARN
	mâle	RR *	30163	27	0.1942	1.73	5 µg ARN
	mâle	RR	30255	28	0.0517	1.69	2 µg ARN
	mâle	RR	30349	29	0.1376	1.82	5 µg ARN
	mâle	TT	30302	30	0.0509	1.46	2 µg ARN
mâle	RR *	30087	31	0.1676	1.78	5 µg ARN	
femelle	RR	30299	32	0.2226	1.65	5 µg ARN	
femelle	RR	30355	33	0.0241	1.98	1 µg ARN	
mâle	TT *	30350	34	0.1211	1.81	5 µg ARN	
femelle	RR	30046	35	0.1224	1.85	5 µg ARN	
femelle	RR *	30296	36	0.136	1.80	5 µg ARN	
femelle	TT	30164	37	0.2817	1.36	10 µg ARN	
mâle	RR	30262	38	0.1042	1.82	5 µg ARN	

\* Animaux des pools

	sexe	Génotype	agneaux	n°	conc (µg/µL)	DO260/280	Qté rétrotranscrite
<i>Vastus medialis</i>	mâle	TT	30254	26	0.1129	1.97	5 µg ARN
	mâle	RR	30163	27	0.1379	1.97	5 µg ARN
	mâle	RR	30255	28	0.1108	1.93	5 µg ARN
	mâle	RR	30349	29	0.1817	1.96	5 µg ARN
	mâle	TT	30302	30	0.1243	1.93	5 µg ARN
	mâle	RR	30087	31	0.1789	1.92	5 µg ARN
	femelle	RR	30299	32	0.1949	1.92	5 µg ARN
	femelle	RR	30355	33	0.129	1.94	5 µg ARN
	mâle	TT	30350	34	0.2343	1.93	5 µg ARN
	femelle	RR	30046	35	0.1077	1.87	5 µg ARN
	femelle	RR	30296	36	0.1277	1.93	5 µg ARN
	femelle	TT	30164	37	0.1485	1.93	5 µg ARN
	mâle	RR	30262	38	0.1735	1.88	5 µg ARN

## Expression des ARNm des différents gènes.

Lorsque le rapport d'expression  $x$  était inférieur à 1 il a été remplacé par  $-1/x$  dans les tableaux, ce qui permet de mieux visualiser le facteur de différence. Pour les moyennes des expressions, si la moyenne est inférieure à 1 nous avons indiqué en dessous le facteur d'expression correspondant. Les moyennes sont exprimés  $\pm$  Erreur Standard.

<b>Semimembranosus</b>	A1AT-1	GDF-8	GDF-8-LIM	GST	TF	SLC40A1
POOL SM-RR	1	1	1	1	1	1
5-RR	2.62	1.07	1.20	-1.33	-1.17	-2.02
7-RR	1.77	1.03	1.15	-1.07	1.36	-1.78
10-RR	1.29	-1.46	-1.41	1.02	-1.23	-2.57
11-RR	-1.62	-2.14	-1.49	1.15	-1.03	-2.24
16-RR	2.60	-1.55	-1.08	-1.06	1.56	-2.45
20-RR	5.62	1.58	1.72	-1.36	1.38	-2.17
22-RR	-1.05	-1.43	-1.50	-1.33	-1.23	-2.84
27-RR	2.33	1.27	1.23	1.27	1.44	-1.00
28-RR	7.81	1.59	1.88	1.10	1.35	1.33
29-RR	5.06	3.58	3.61	3.71	2.15	2.77
31-RR	1.02	1.29	1.31	1.56	1.18	1.14
32-RR	3.38	1.84	1.86	1.19	1.03	1.34
33-RR	2.77	1.22	2.07	1.65	1.02	1.24
35-RR	1.22	1.66	1.81	1.11	-1.16	1.00
36-RR	1.39	1.72	1.81	1.35	1.39	1.55
38-RR	1.77	1.78	1.77	1.81	-1.38	2.78
POOL SM-TT	2.62	-1.67	-1.80	-1.39	-1.27	-1.52
1-TT	2.13	-1.19	-1.15	-1.04	1.32	-1.94
2-TT	3.76	-3.18	-3.04	-1.20	-1.30	-2.54
6-TT	4.27	-1.97	-1.88	1.06	1.35	-1.62
8-TT	1.29	-2.93	-3.04	-1.31	-1.42	-2.56
9-TT	3.79	-1.52	-1.23	2.11	1.23	1.38
14-TT	6.91	-1.21	-1.19	-1.03	1.16	-1.76
17-TT	3.11	-1.32	-1.01	-1.30	-1.52	-2.31
18-TT	5.75	-1.16	1.18	1.01	1.11	-2.40
19-TT	5.88	-2.72	-2.64	-1.68	-1.60	-3.07
23-TT	39.32	-1.47	-1.55	1.28	2.11	1.38
26-TT	2.75	1.25	1.33	1.39	1.18	-1.33
30-TT	4.99	1.73	2.12	2.37	-1.27	1.79
34-TT	2.84	-1.08	-1.16	1.68	1.43	1.12
37-TT	-1.24	1.03	-1.08	-1.32	-2.76	ND
POOL SM-RT	-1.11	-1.38	-1.42	-1.75	-1.52	-2.78
3-RT	1.38	1.58	1.69	-1.38	-1.66	-2.34
4-RT	13.49	1.12	1.13	1.66	2.24	1.00
12-RT	1.10	-2.61	-2.54	-1.34	-1.16	-3.37
13-RT	2.23	-3.20	-3.30	-1.60	-1.56	-5.80
15-RT	2.35	-2.32	-2.27	-2.03	-2.27	-7.26
21-RT	2.09	-1.04	-1.02	-1.43	-1.39	-2.08
moy SM-RR	2.64 $\pm$ 0.66	1.38 $\pm$ 0.35	1.52 $\pm$ 0.38	1.31 $\pm$ 0.33	1.18 $\pm$ 0.30	1.08 $\pm$ 0.27
moy SM-TT	6.26 $\pm$ 1.67	0.79 $\pm$ 0.21 -1.26	0.87 $\pm$ 0.23 -1.15	1.18 $\pm$ 0.32	1.06 $\pm$ 0.28	0.78 $\pm$ 0.21 -1.29
moy SM-RT	3.77 $\pm$ 1.54	0.80 $\pm$ 0.33 -1.25	0.82 $\pm$ 0.34 -1.22	0.82 $\pm$ 0.34 -1.21	0.92 $\pm$ 0.37 -1.09	0.42 $\pm$ 0.17 -2.39

<b>Vastus medialis</b>	A1AT-1	GDF-8	GDF-8-LIM	GST	TF	SLC40A1
VM-RR artificiel	1	1	1	1	1	1
27-RR	-2.08	1.57	1.68	-1.33	1.33	-1.52
28-RR	1.80	-1.01	-1.01	-1.33	-1.02	-1.28
29-RR	8.66	2.89	3.11	2.19	2.55	2.21
31-RR	-1.82	-1.54	-1.41	1.00	-1.14	-1.33
32-RR	-1.22	-1.59	-1.75	-1.16	-1.59	-1.08
33-RR	-2.04	-1.02	1.14	-1.45	-2.27	-1.19
35-RR	-4.55	1.44	1.74	-1.69	-1.49	-1.69
36-RR	-1.09	-2.56	-2.27	-1.22	1.12	1.31
38-RR	1.96	-2.38	-2.08	2.04	1.20	2.34
26-TT	-1.19	1.19	1.33	-1.23	-1.30	-1.47
30-TT	5.40	2.32	2.27	3.03	1.23	3.62
34-TT	6.09	-2.33	-2.22	-1.19	1.13	-1.27
37-TT	-1.16	-4.17	-3.70	-1.79	-1.45	-1.47
moy VM-TT	3.30 ± 1.23	1.05 ± 0.41	1.08 ± 0.40	1.31 ± 0.50	0.96 ± 0.11 -1.05	1.44 ± 0.63
moy VM-RR	1.77 ± 0.83	1.11 ± 0.25	1.21 ± 0.27	1.08 ± 0.19	1.09 ± 0.19	1.16 ± 0.21

Les valeurs de Ct ont été comparées à celle d'un pool RR créé artificiellement à partir de toutes les données RR grâce au logiciel SDS2.2.2.

<b>Fœtus</b>	A1AT-1	GDF-8	GDF-8-LIM	GST	TF	SLC40A1
F-RR	1	1	1	1	1	1
F13-RR	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
F10-TT	-1.43	-1.33	-1.34	1.03	-1.48	-1.04
F12-TT	-1.42	-1.43	-1.79	1.01	-1.11	1.24
F14-TT	-1.42	-1.45	-1.51	-1.14	-1.80	1.20
F1-TT	1.73	-1.25	-1.39	1.40	1.68	1.86
F2-TT	-1.23	-2.02	-1.38	1.18	1.07	1.05
F4-TT	1.08	-2.66	-1.98	1.16	-1.70	-1.11
F6-TT	1.06	-1.98	-1.60	1.28	1.76	1.18
F7TT	-1.35	-1.86	-1.46	1.26	1.23	1.35
F8-TT	2.22	-1.34	-1.36	1.20	1.62	1.67
F9-TT	-1.08	-1.71	-1.64	1.50	-1.05	1.18
F11-RT	-1.42	-1.88	-1.45	1.21	-1.69	-1.17
F3-RT	1.54	-1.22	-1.13	-1.01	-1.40	1.16
moy F-TT	1.07 ± 0.15	0.62 ± 0.04 -1.62	0.66 ± 0.02 -1.52	1.19 ± 0.06	1.11 ± 0.14	1.26 ± 0.09
moy F-RT	1.12 ± 0.29	0.68 ± 0.10 -1.48	0.79 ± 0.07 -1.27	1.10 ± 0.08	0.65 ± 0.04 -1.53	1.00 ± 0.11

Les valeurs de Ct ont été comparées à celle d'un pool RR créé artificiellement à partir de toutes les données RR grâce au logiciel SDS2.2.2.

## RESUME

La mutation "Texel Belge" (QTL associé au chromosome 2 ovin) est une mutation partiellement dominante qui induit une hypertrophie musculaire chez le mouton. Cette mutation identifiée récemment affecte le gène codant pour la myostatine. Elle touche l'ensemble de la musculature mais surtout les muscles du membre postérieur sans altération des qualités sensorielles. Ainsi son utilisation pour la production d'agneaux de boucherie présente un intérêt économique évident. Toutefois les mécanismes physiologiques et biochimiques sous jacents ne sont pas encore élucidés. Pour mieux appréhender ces mécanismes, nous nous sommes intéressés au protéome de différents muscles de la cuisse et du dos. Nous avons orienté notre étude sur la fraction sarcoplasmique du protéome musculaire, fraction la moins étudiée jusqu'à présent dans le cadre des hypertrophies musculaires. Or c'est dans cette fraction que se trouvent toutes les protéines du métabolisme et des voies de transduction du signal. Nous avons réalisé une étude comparative en gels d'électrophorèse bidimensionnelle d'échantillons musculaires d'animaux homozygotes Texel et homozygotes Romanov au locus "Texel".

Mais auparavant nous avons comparé des muscles aux compositions en type de fibre variées et présentant différents degrés d'hyper-développement chez les individus TT (*Vastus medialis*, *Longissimus dorsi*, *Semimembranosus* et *Tensor fasciae latae*). Nous avons montré que tout comme pour les types de myosines, il existe des variations de l'expression des protéines du métabolisme énergétique et de la machinerie associée caractérisant chaque muscle. Il s'avère donc utopique de vouloir décrire les effets de la mutation à partir de l'étude d'un seul muscle. C'est pourquoi, nous avons poursuivi notre comparaison des génotypes sur les quatre muscles. Nous avons montré une surexpression des métabolismes énergétiques, tant glycolytique qu'oxydatif. Deux protéines semblent marquer plus particulièrement le génotype TT, la transferrine (sur-exprimée) et l' $\alpha$ -1-antitrypsine (sous-exprimée). La transferrine a des effets myogéniques importants et l' $\alpha$ -1-antitrypsine est capable d'inhiber la fixation de la transferrine sur son récepteur. Elles peuvent donc être impliquées dans la mise en place de l'hyper-développement musculaire. En étudiant l'expression des ARNm de ces protéines ainsi que de ceux de la myostatine, nous avons montré que ni la transferrine ni l' $\alpha$ -1-antitrypsine n'étaient régulés au niveau transcriptionnel et que les ARNm de la myostatine étaient sous-exprimés dans le génotype TT. Nous avons également montré que ces 3 gènes (Myostatine, alpha-1-antitrypsine et transferrine) étaient plus fortement exprimés chez les fœtus que dans les muscles d'animaux subadultes. Ce qui laisse supposer, pour ces gènes, un rôle important dans le développement musculaire.

L'étude du protéome du modèle hyperdéveloppé Texel a permis de mettre en évidence différentes protéines, donc gènes susceptibles d'être impliqués dans les mécanismes du développement musculaire. Il serait intéressant d'étudier leurs cinétiques d'expression à des stades clefs depuis la vie fœtale jusqu'aux stades adultes et ceci en interaction avec l'expression des miARN et de la myostatine. Dans cette étude, des modèles musculaires n'exprimant pas l'hypertrophie, tel le VM, devraient apporter des informations intéressantes pour la compréhension des mécanismes.