

Recherche de marqueurs de tendreté de la viande de jeunes bovins de races à viande par analyse protéomique

CHAZE T. (1), HOCQUETTE J.F. (1), MEUNIER B. (1), RENAND G. (2), JOURNAUX L. (3), CAPEL C. (4), PICARD B. (1)
(1) INRA UR1213, unité de recherches sur les herbivores, Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, (2) INRA, UMR1313
Génétique animale et biologie intégrative, 78352 Jouy-en-Josas, (3) UNCEIA, MNE, 149 rue de Bercy, 75595 Paris Cedex 12,
(4) Institut de l'élevage, 149 rue de Bercy, 75595 Paris Cedex 12

RESUME - Dans l'objectif de mettre en évidence de nouveaux marqueurs de tendreté de la viande bovine, une analyse protéomique a été réalisée sur le muscle *Longissimus thoracis* de deux lots extrêmes de dix animaux pour chacune des trois principales races à viande françaises Blonde d'Aquitaine, Charolaise, Limousine. La constitution des lots a été faite sur la base d'un index combinant à la fois la note de tendreté estimée par analyse sensorielle et la valeur de la force de cisaillement (Warner-Bratzler). Ce choix a été fait parmi trois mille trois cents jeunes bovins. Le nombre important d'animaux a permis de choisir les dix animaux de chaque lot toutes choses égales en termes de caractéristiques musculaires (fibres, collagène, lipides). Les protéines extraites des muscles des animaux des lots extrêmes 24 h après abattage ont été analysées par électrophorèse bidimensionnelle et spectrométrie de masse. Les différences d'abondance entre spots permettent de retenir plusieurs protéines comme marqueurs potentiels de la tendreté. Ces marqueurs ne sont pas toujours les mêmes selon les races.

Research of beef tenderness markers in young bulls by proteomic analysis

CHAZE T. (1), HOCQUETTE J.F. (1), MEUNIER B. (1), RENAND G. (2), JOURNAUX L. (3), CAPEL C. (4), PICARD B. (1)
(1) INRA UR1213, Unité de Recherches sur les Herbivores, Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle

SUMMARY - In order to identify new markers of beef tenderness, a proteomic analysis was performed on *Longissimus thoracis* muscle of two extreme groups of 10 animals each from the three main French beef breeds: Blond d'Aquitaine, Charolais, Limousin. Animals were grouped on the basis of an index combining tenderness score estimated by a trained panel and mechanical shear force measurement (Warner-Bratzler). The great number of available experimental animals (i.e., 3300 young bulls) allowed choosing animals with different meat tenderness but similar muscle main characteristics (fibres, collagen, lipids). The muscle proteins of the extreme groups considered 24 h after slaughter were analysed by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. Protein markers of tenderness were identified for each breed; they varied according to breed.

INTRODUCTION

La tendreté de la viande bovine présente une très forte variabilité non maîtrisée. Les caractéristiques musculaires connues pour leur rôle dans cette qualité sensorielle et étudiées depuis de nombreuses années (fibres, collagène, lipides) expliquent au mieux environ 30 % de cette variabilité (Renand *et al.*, 2001 ; Picard *et al.*, 2007). Aussi, au cours des dernières années plusieurs programmes de génomique fonctionnelle ont été mis en place pour identifier de nouveaux marqueurs de tendreté au niveau gène, ARN messager (ARNm) ou protéine (Hocquette *et al.*, 2007a). Parmi ces différents programmes, Qualvigène B (appel d'offre GENANIMAL-APISGENE 2008) s'appuie sur le puissant dispositif expérimental de Qualvigène (appel d'offre GENANIMAL-APISGENE 2006), basé sur le génotypage et l'analyse phénotypique poussée (mesures de trente variables d'aptitude bouchère, de composition de carcasse, de caractéristiques musculaires et de qualité de viande) de plus de trois mille trois cents jeunes bovins des trois principales races à viande françaises (Blonde d'Aquitaine, Charolaise et Limousine). Ce dispositif a été utilisé comme base pour le choix d'animaux présentant un différentiel en tendreté. L'originalité de ce programme est que ce choix s'est fait sur la base d'un index combinant à la fois les notes de jury d'analyse sensorielle et les mesures de force de cisaillement par Warner-Bratzler. D'autre part, le nombre important d'animaux a permis de générer un différentiel important entre les deux groupes extrêmes et de constituer des lots de taille bien supérieure à ceux étudiés précédemment. Enfin, l'ensemble des données de caractéristiques musculaires disponibles a permis de choisir des animaux extrêmes sur l'index tendreté mais toutes choses égales par ailleurs en terme de surface de section transversal des fibres, teneur en collagène et lipides, ce qui ne pouvait pas être réalisé dans les autres programmes. La

présente étude avait pour objectif, en s'appuyant sur ce protocole expérimental particulièrement puissant et original, de révéler les différences d'abondance des protéines en relation avec les extrêmes de tendreté.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. CHOIX DES ANIMAUX

Soixante jeunes bovins ont été choisis pour l'analyse protéomique sur la base d'un indice synthétique qui combine positivement la note de tendreté et négativement le logarithme de la force de cisaillement, ces variables étant standardisées par rapport à la variabilité phénotypique de chaque population. Par race, vingt animaux ont été retenus, soit dix par groupe extrême de tendreté. Ne furent retenus que des jeunes bovins qui avaient des caractéristiques musculaires (taille des fibres musculaires, teneurs en collagène et en lipides intramusculaires) dans la moyenne ($\pm 0,7$ écart type) et qui n'étaient pas porteurs de mutation dans le gène de la myostatine.

1.2. ANALYSE PROTEOMIQUE

A partir du muscle *Longissimus thoracis* (LT, entrecôte) prélevé au niveau de la sixième côte 24 h après abattage, une extraction totale des protéines musculaires a été réalisée selon le protocole de Bouley *et al.* (2004a) pour chacune des trois races. La quantité de protéines extraites a été déterminée à l'aide du kit 2-DE Quant (Amersham Uppsala, Suisse). Pour chacun des soixante échantillons les protéines ont été séparées en fonction de leur point isoélectrique en première dimension en gradient de pH 4-7 (IPG strips Amersham) selon la technique décrite par Bouley *et al.* (2004a). La seconde séparation selon le poids moléculaire, a été réalisée selon la méthode SDS-PAGE (T = 12 %) suite à une migration en cuve *Protean Plus Dodeca cell system* (Biorad, Hercules, USA) à un ampérage de 15 mA par gel et un voltage de 110 volts

jusqu'à ce que le bleu de bromophénol atteigne le bas des gels. Après coloration au bleu colloïdal (G250) (Bouley *et al.*, 2004a), les gels ont été scannés à 300 dpi (*dots per inch*) (scanner Epson 10000XL Pro), puis analysés à l'aide du logiciel d'analyse d'images SameSpot v.3. L'analyse a été faite par race puisque les critères d'abattage différaient entre les trois races et les analyses sensorielles ont été effectuées par un jury différent pour chacune des trois races, ce qui rend impossible une analyse toutes races confondues.

Une première étape d'exploration sans a priori des trois matrices de données a été réalisée par analyse en composantes principales (ACP) sous le logiciel de statistique R (*package FactoMiner*). Dans un second temps, les spots protéiques différentiels entre lots de tendreté ont été révélés par analyse statistique ANOVA en considérant comme significatives des valeurs de $p < 0,05$.

Les protéines apparaissant différentes entre groupes de tendreté ont été identifiées par spectrométrie de masse Maldi-Tof sur la Plateforme du centre INRA de Theix, pour chacune des trois races, avec un taux moyen d'identification des spots d'environ 50 %. Pour cela, les spots d'intérêt ont été excisés des gels d'acrylamide, décolorés à l'acétonitrile puis digérés dans trois volumes de trypsine pendant cinq heures à 37°C (Bouley *et al.*, 2004a). Les peptides obtenus ont été analysés à l'aide d'un spectromètre MALDI-TOF (*Perspective Biosystem, Farminghan, MA, USA*). L'identification des empreintes peptidiques s'est faite par interrogation des bases de données *Bos taurus* Swiss Prot 51.6 (Octobre 2008, 257964 séquences) et également la base mammifères NCBI.

1.3. VALIDATION PAR WESTERN-BLOTS

Une validation des différentielles protéiques entre lots extrêmes de tendreté a été effectuée par western blots. Les anticorps suivants ont été utilisés : anti HSP27 (1/5000), Alpha Actin(1/1000), DJ-1 (1/4000), HSP20 (1/1000), Enolase 3 (1/1000) (SantaCruz); CapZbeta (1/10000), Phosphoglucomutase 1 (1/16000), GAPDH (1/1000), *Stress-induced-phosphoprotein 1* (1/1000) (Abnova), alpha Crystallin B (1/500) (Assay Design). La révélation a été faite soit par chimioluminescence en utilisant le kit ECL (Amersham) soit par fluorescence (anticorps secondaire marqué par un fluorochrome) selon le protocole décrit dans Chaze *et al.* (2008).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les différentiels obtenus par le processus de sélection mis en œuvre sont rapportés dans le tableau 1. Il a été possible de générer des différentiels conséquents de 6,4 à 7,7 écarts types sur l'indice synthétique de tendreté entre les lots de dix jeunes bovins les plus extrêmes de chaque race.

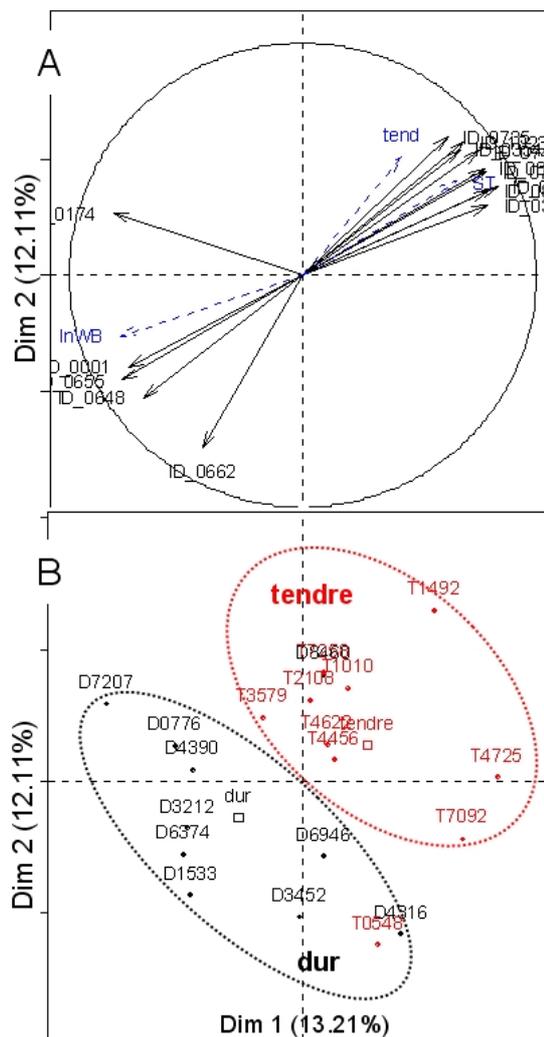
L'ACP réalisée sur l'ensemble des spots révélés pour chacune des races a montré une distinction correcte des groupes de tendreté en particulier en race Blonde d'Aquitaine (figure 1), puisqu'une part majeure de l'inertie totale (25,3 %) est liée à l'index de tendreté.

Tableau 1 : différences entre lots « dur » et lots « tendre »

Race	Caractère	Différentiel	é.t.*	Diff./é.t.
Blonde	Note Tend.	+33 (/100)	11	+3,0
	Force Cisail.	-32 (N/cm ²)	10	-3,1
Charolaise	Note Tend.	+24 (/100)	8	+3,2
	Force Cisail.	-28 (N/cm ²)	7	-4,0
Limousine	Note Tend.	+29 (/100)	7	+3,9
	Force Cisail.	-27 (N/cm ²)	7	-3,7

é.t. : écart type phénotypique

Figure 1 : analyse en composantes principales sur la matrice Blonde d'Aquitaine (vingt individus x 424 spots protéiques). Le graphe des individus [B] oppose assez distinctement les deux lots de tendreté sur les deux premières dimensions. Le graphe des variables [A] illustre les spots les plus impliqués dans cette distinction (D : dur ; T : tendre). L'index (ST) combinant à la fois la note d'analyse sensorielle (tend) et la force de cisaillement (lnWB) est projeté comme variable illustrative.



L'ANOVA a révélé 15 % de spots protéiques dont l'abondance était différente entre les deux lots de tendreté en race Blonde d'Aquitaine, 8 % en Limousin et 10 % en Charolais. Dans les tableaux 2 à 4 sont présentées les protéines les plus discriminantes pour chacune des trois races. De façon générale, il apparaît dans les trois races que des protéines représentatives du type rapide glycolytique sont plus exprimées dans les viandes les plus dures. C'est le cas de la PGM en Charolais, la GAPDH en Limousin, les isoformes de troponine T rapide en Charolais et Blond d'Aquitaine, et la β Enolase en Limousin et Blond d'Aquitaine. Au contraire, les protéines caractéristiques du type lent oxydatif sont plus exprimées dans les viandes les plus tendres. On peut citer l' α Enolase en Limousin, une isoforme de Troponine T lente et des isoformes lentes de chaînes légères de myosine en Blond d'Aquitaine ainsi que la créatine kinase M et la protéine mitochondriale NADH-ubiquinone oxydoréductase. D'autres expérimentations arrivent à des conclusions similaires sur la relation entre métabolisme oxydatif et tendreté (Hocquette *et al.*, 2007b). Notamment Morzel *et al.* (2008) identifiaient la SDH (succinate deshydrogénase, enzyme du métabolisme oxydatif) comme le meilleur prédicteur de la tendreté pour le

LT de taurillons Blond d'Aquitaine classés sur la base des notes de tendreté, expliquant à lui seul 57,8 % de la tendreté globale. Dans notre cas, ce n'est pas la SDH qui ressort comme la plus explicative mais d'autres protéines du métabolisme oxydatif. On peut toutefois noter que les protéines α cristalline B et Créatine kinase qui apparaissent explicatives de la tendreté dans les travaux de Morzel *et al.* (2008), sont également retrouvées dans notre étude bien que les critères de constitution des lots ne soient pas strictement identiques.

Tableau 2 : liste des principales protéines discriminant les deux lots de tendreté en race Blonde d'Aquitaine (les chiffres indiquent le nombre de spots)

Protéine	+ en viande dure	+ en viande tendre
<i>Troponin T slow</i>	1	
<i>Troponin T fast</i>	6	
<i>WD repeat containing protein 1</i>	1	
β Enolase	1	
α cristallin B chain	1	
<i>Heat Shock protein β6 (HSP20)</i>	1	
Creatine kinase M-type		2
<i>Myosin regulatory light chain 2</i>		1
<i>NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial precursor</i>		1
<i>14-3-3 protein epsilon</i>		1
<i>F-actin capping protein subunit β</i>		1
<i>Myosin light chain 3</i>		1
Actin α		1

Tableau 3 : Liste des principales protéines discriminant les deux lots de tendreté en race Charolaise

Spot Protéique	+ en viande dure	+ en viande tendre
<i>Myosin regulatory light chain 2</i>	1	1
<i>Phosphoglucomutase 1 (PGM)</i>	1	
<i>Troponin T fast</i>	3	
<i>F-actin capping protein subunit β</i>	1	
Glutathione S-transferase P		1
<i>Proteasome subunit β2</i>		1
<i>Protein DJ-1</i>		2
Actin α e		1

De manière intéressante, la protéine α actine est plus exprimée dans les viandes les plus tendres dans chacune des trois races, ce qui en fait un candidat potentiel intéressant. De plus, elle a été identifiée comme discriminante entre lots de tendreté sensorielle ou mécanique dans d'autres travaux (Bouley *et al.*, 2004b ; Hocquette *et al.*, 2007b ; Morzel *et al.*, 2008). Cette différence d'abondance a été confirmée par western-blot à l'aide d'un anticorps spécifique dans les trois races. Cette protéine de structure subit des modifications au cours de la phase de maturation *post-mortem* suite à son clivage par les systèmes protéolytiques. Le fait qu'elle apparaisse comme un bon marqueur de tendreté dans plusieurs situations semble donc cohérent.

Si nous mettons en évidence une relative cohérence entre races pour certaines protéines, d'autres montrent des résultats opposés selon la race. Par exemple la protéine DJ-1 est plus exprimée dans les viandes les plus dures en Limousin et dans les viandes les plus tendres en Charolais, sans différences en Blond d'Aquitaine. Ces résultats ont été confirmés en western blot. La protéine DJ1 avait déjà été identifiée dans d'autres travaux en race charolaise. Elle participe à la lutte cellulaire

contre les effets du stress oxydant en protégeant les protéines de l'agrégation. Elle inhibe également l'apoptose (mort cellulaire programmée) par interaction avec d'autres protéines, en particulier la protéine HSP27.

Tableau 4 : liste des principales protéines discriminant les deux lots de tendreté en race Limousine

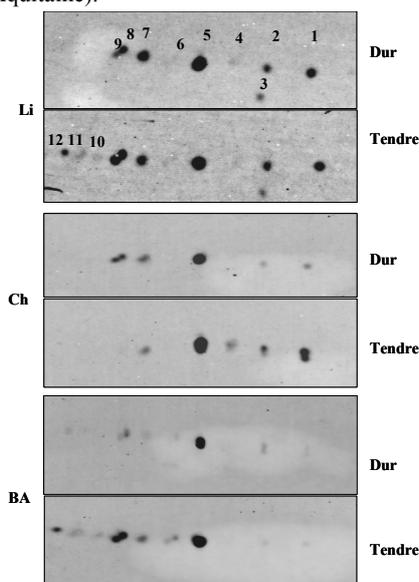
Spot Protéique	+ en viande dure	+ en viande tendre
β Enolase	1	
<i>F-actin capping protein subunit β</i>	1	
<i>Stress induced phosphor protein 1</i>	1	
<i>Geranylgeranyl transferase type2 subunit α</i>	1	
<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)</i>	1	
<i>Protein DJ-1</i>	1	
α Enolase		1
<i>26S protease regulatory subunit</i>		1
<i>Rab GDP dissociation inhibitor β</i>		1
<i>Capping protein muscle Z-line α2</i>		1
<i>α cristallin B chain</i>		1
<i>Heat Shock protein β6 (HSP20)</i>	1	2
Actin α		1

Dans notre étude, l'analyse protéomique a révélé trois spots de HSP27 significativement plus abondants en viandes dures et six plus abondants en viandes tendres pour les Limousins, un seul spot plus abondant en viande dure et un autre en viande tendre en Charolais et trois spots plus abondants en viande dure et trois plus abondants en viande tendre pour les Blond d'Aquitaine (résultats non illustrés dans les tableaux). Cette protéine a été identifiée comme étant différentiellement exprimée entre lots de tendreté extrême dans plusieurs travaux (au niveau protéine et / ou ARNm) dans différentes races (Bouley *et al.*, 2004b ; Bernard *et al.*, 2007 ; Hocquette *et al.*, 2007b ; Morzel *et al.*, 2008). Elle agit en interaction avec d'autres partenaires, en particulier HSP70 et α cristalline B avec lesquelles elle forme un complexe dynamique qui permet de protéger plus particulièrement les enzymes du métabolisme oxydatif et des protéines myofibrillaires (comme la desmine, l'actine, la myosine, la titine) lors de stress cellulaires. Par son rôle anti-apoptique la HSP 27 associée à ses partenaires semble jouer un rôle important dans la tendreté. Ceci est tout à fait en accord avec la théorie de Ouali *et al.* (2006) qui propose que l'apoptose aurait un rôle primordial dans les premières phases de la maturation. Toutefois, la relation entre HSP27, son partenaire α cristalline B et la tendreté n'est pas si claire puisque dans certaines études, ces protéines sont reliées positivement à la dureté et d'autre fois à la tendreté. En particulier dans notre étude, α cristalline B est plus exprimée dans les viandes les plus tendres en Limousin et dans les viandes les plus dures en Blond d'Aquitaine.

Pour ce qui est de HSP27, plusieurs spots protéiques correspondent à cette protéine et selon les expérimentations, ce n'est peut-être pas toujours le même spot qui a été considéré. Afin d'analyser plus précisément la relation entre ces différents spots de HSP 27 et la tendreté, nous avons utilisé un anticorps spécifique pour effectuer des western-blots sur les isoformes séparées en gels d'électrophorèses bidimensionnelles (figure 2).

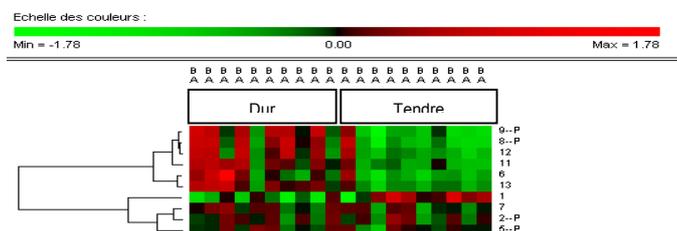
Ainsi, nous mettons en évidence au total douze spots différents de HSP27 qui diffèrent entre races mais aussi entre lots de tendreté dans chacune des trois races.

Figure 2 : révélation des différents spots de HSP27 sur gels d'électrophorèses bidimensionnelles par western-blot à l'aide d'un anticorps spécifique, pour chacune des trois races pour les lots tendres et durs (Li : Limousin, Ch : Charolais, BA : Blonde d'Aquitaine).



C'est en race Limousine que nous observons le plus de spots. Dans cette race, comme en Blonde d'Aquitaine, les spots 10, 11, 12 semblent être plus abondants dans les viandes tendres. Une coloration au Pro Q Diamond (*Molecular Probes, Eugene, OR*) selon le protocole de Agrawal et Thelen (2005) a permis de montrer que les spots numérotés 2, 5, 8 et 9 sont phosphorylés. Une classification hiérarchique a été faite sur l'ensemble de ces spots pour les vingt animaux durs et tendres dans chacune des races. Elle a montré qu'en Blonde d'Aquitaine, l'ensemble des spots 6, 8, 9, 12, 11, 13 permet globalement une bonne discrimination des viandes tendres et dures avec un niveau plus faible de ces spots pour les viandes tendres (figure 3). Cette relation ne se retrouve toutefois pas dans les deux autres races.

Figure 3 : analyse par classification hiérarchique faite sur l'ensemble des douze spots HSP27 pour les vingt animaux produisant une viande tendre ou dure (dix par groupe) en race Blonde d'Aquitaine. P = phosphorylé (une concentration élevée s'exprime en noir).



D'autre part, deux protéines associées à l'activité du protéasome apparaissent plus exprimées dans les viandes les plus tendres en Charolais (sous unité β type2 du protéasome) et en Limousin (sous unité 7 régulatrice de la protéase 26S). Etant donné l'implication des systèmes protéolytiques dans la maturation de la viande, ce type de relation paraît tout à fait logique.

Deux protéines, jamais révélées dans les programmes précédents, apparaissent plus exprimées dans les viandes les plus dures en race Limousine. Il s'agit de la Geranylgeranyl

transferase type2 subunit α et de la Rab GDP dissociation inhibitor β . Ces deux protéines sont impliquées dans le transport cellulaire et ont un rôle dans le relargage calcique du réticulum sarcoplasmique. Elles pourraient donc avoir un rôle dans les flux calciques *post-mortem*, non décrit jusqu'à présent.

Enfin, la protéine 14-3-3 dont l'implication dans la tendreté de la viande n'a jamais été décrite, apparaît plus exprimée dans les viandes de tendreté supérieure en race Blonde d'Aquitaine. Elle appartient à une superfamille capable de s'associer à différentes protéines : kinases, phosphatases, récepteurs transmembranaires lors de régulations des voies de signalisation cellulaire.

CONCLUSION

Cette étude basée sur un protocole expérimental original en termes de constitution de lots extrêmes (sur la base d'un index combinant à la fois la tendreté sensorielle et mécanique) a permis d'une part de consolider des données sur des protéines précédemment identifiées comme marqueurs potentiels respectivement de tendreté ou de dureté de la viande. D'autre part, elle a montré que les protéines les plus explicatives de la tendreté ne sont pas les mêmes selon les races même si globalement elles ont des fonctions biologiques similaires. Cette approche permet aussi de révéler des protéines dont le rôle dans la tendreté n'a jamais été décrit et donc d'avancer dans la compréhension des mécanismes biologiques impliqués dans l'élaboration de ce critère de qualité. Cette étude associée à d'autres travaux similaires conduits dans notre équipe permettra à terme de retenir parmi les protéines ainsi révélées un ensemble qui sera utilisé pour la mise au point d'un outil de phénotypage permettant d'analyser le potentiel tendreté d'un animal à partir d'une biopsie musculaire (voir texte de Guillemain *et al.*, 3R 2009).

Cette étude a été financée par le programme QUALVIGENE B (ANR GENANIMAL -APISGENE)

- Agrawal G.K. and Thelen J.J., 2005, *Proteomics*, 5:4684-88.
 Bernard, C., Cassar-Malek, I., LeCunff, M., Dubroeuq, H., Renand, G., Hocquette, J. F. 2007, *J. Agric. Food Chem.*, 55 (13): 5229-5237.
 Bouley, J., Chambon, C., Picard, B. 2004a, *Proteomics*, 4 (6), 1811-1824.
 Bouley J., Meunier B., Culioli J., Picard B. 2004b, *Renc. Rech. Ruminants*, 87-89.
 Chaze T., Meunier B., Chambon C., Jurie C., Picard B. 2008, *Proteomics*, 8, 4236-4248
 Hocquette, J. F., Leveziel, H., Renand, G., Malafosse, A. 2007a, *Cahiers Agricultures*, 16 (3), 163-169.
 Hocquette, J. F., Bernard, C., Cassar-Malek, I., Lepetit, J., Micol, D., Jurie, C., Meunier, B., Renand, G., Picard, B. 2007b, *Renc. Rech. Ruminants*, 14, 117-120.
 Morzel, M., Terlouw, C., Chambon, C., Micol, D., Picard, B. 2008, *Meat Sci.*, 78 (3), 297-304.
 Ouali, A., Herrera-Mendez, C. H., Coulis, G., Becila, S., Boudjellal, A., Aubry, L., Sentandreu, M. A. 2006, *Meat Sci.*, 74 (1), 44-58.
 Picard, B., Jurie, C., Bauchart, D., Dransfield, E., Ouali, A., Martin, J. F., Jailler, R., Lepetit, J., Culiolo, J. 2007, *Sci. Aliments*, 27/2, 168-180.
 Renand, G., Picard, B., Touraille, C., Berge, P., Lepetit, J. 2001, *Meat Sci.*, 59 (1), 49-60.