

Analyse protéomique du muscle de Bovin appliquée à la recherche de marqueurs de la tendreté de la viande

J. BOULEY (1), B. MEUNIER (1), J. CULIOLI (2), B. PICARD (1)

(1) Unité de Recherches sur les Herbivores,

(2) Station de Recherches sur la Viande,

INRA, Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France

RESUME - Face à la difficulté de la filière bovine à maîtriser la forte variabilité de tendreté de la viande, l'objectif de cette étude était d'utiliser l'analyse protéomique pour mettre en évidence des indicateurs de tendreté de la viande bovine. Pour cela le muscle semitendineux (ST) ou Rond de Gîte, de trois races (Charolaise, Limousine, Salers) de taurillons de 15 mois a été étudié. Des études des caractéristiques musculaires et de la viande avaient été préalablement effectuées sur ces échantillons. Ainsi, le muscle ST a pu être classé en différentes classes de tendreté sur la base des notes d'un jury d'analyse sensorielle (Drandsfield *et al.*, 2003). Nous avons constitué deux lots d'échantillons de tendreté extrême (avec deux échantillons de ST pour chaque race). Les deux lots ont été comparés par analyse protéomique selon le protocole de Bouley *et al.*, (2004) (gradient de pH 4-7 en première dimension et électrophorèse SDS-PAGE en seconde). Les protéines différenciellement exprimées ont été identifiées grâce à la cartographie établie par Bouley *et al.*, (2004) ou par spectrométrie de masse. Les résultats obtenus révèlent 10 protéines différenciellement exprimées. Ces protéines diffèrent entre les races à viande et la race rustique Salers. Ces résultats préliminaires vont être confirmés sur un plus grand nombre d'échantillons.

Proteomic analysis applied to the research of tenderness markers

J. BOULEY (1), B. MEUNIER (1), J. CULIOLI (2), B. PICARD (1)

INRA, Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France

SUMMARY - To explain the large variability of beef meat tenderness, the aim of this study was to compare the Semitendinosus muscle (ST) of two classes of tenderness (high and low) by proteomics. ST samples of young bulls from three French breeds (Charolais, Limousin, Salers) were classified on the basis of the note of tenderness attributed by a jury of tasters (Drandsfield *et al.*, 2003). The proteins of the two groups of young bulls were separated by two-dimensional electrophoresis (pH 4-7 in the first dimension and 11% SDS-PAGE in the second one) according to the protocol of Bouley *et al.* (2004). Proteins differentially expressed were identified with the ST map established by Bouley *et al.* (2004) or by mass spectrometry. The results revealed ten proteins differentially expressed between the two groups. These proteins were not the same for the meat breed and rustic breed. These preliminary results will be confirmed on a larger number of samples.

INTRODUCTION

La variabilité forte et non maîtrisée de la tendreté de la viande bovine demeure un problème majeur pour la filière bovine. Les nombreux travaux réalisés ont montré que cette variabilité est la conséquence d'une part des conditions d'abattage des animaux, de maturation et de cuisson des viandes et d'autre part du type génétique des animaux et de leurs conditions d'élevage dont dépendent les propriétés des muscles. Le rôle de caractéristiques musculaires telles que la surface et le type de fibres, les propriétés du collagène et la teneur en lipides a été bien démontré. Cependant, ces caractéristiques expliquent au plus 30 à 40 % de la variabilité de la tendreté (Picard *et al.*, 2001). Aussi, l'objectif de cette étude était de mettre en évidence de nouveaux indicateurs de la tendreté de la viande bovine par une démarche de génomique fonctionnelle utilisant l'analyse du protéome de muscle bovin.

1. MATERIEL ET METHODES

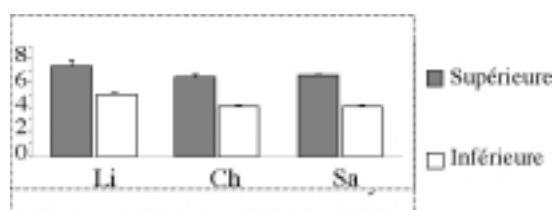
1.1. ANIMAUX ET MUSCLE

L'étude a porté sur le muscle semitendineux (ST), ou Rond de Gîte, de taurillons de 15 mois de trois races : Charolaise, Limousine et Salers. Des échantillons de muscle ST ont été prélevés dans l'heure suivant l'abattage et congelés dans l'azote liquide pour les mesures biochimiques. D'autres ont été prélevés 24 heures après l'abattage et ont mûré pendant 14 jours puis ont été analysés par un jury d'analyse sensorielle. Ils ont été classés en fonction de la note de tendreté (note sur une échelle de 1 à 10) (Drandsfield *et al.*, 2003).

1.2. METHODES

Nous avons analysé par électrophorèse bidimensionnelle (E2D) selon le protocole décrit par Bouley *et al.*, (2004), des échantillons de muscle de tendreté extrême (supérieure ou inférieure) pour chaque race.

Figure 1 : notes de tendreté des deux classes de taurillons des trois races



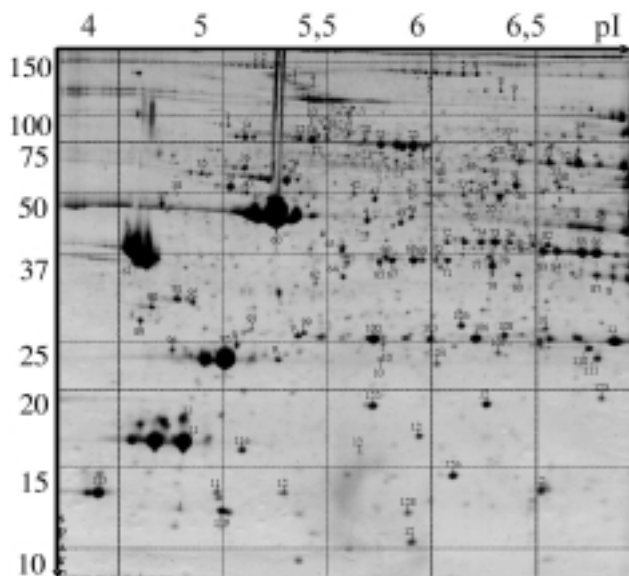
Deux échantillons de muscle ST ont été analysés pour chaque race et chaque classe de tendreté. Trois gels d'E2D ont été réalisés pour chaque échantillon.

Les protéines musculaires ont été séparées en première dimension en fonction de leur point isoélectrique en gradient de pH 4-7. En seconde dimension, elles ont été séparées selon leur poids moléculaire dans un gel à 11 % d'acrylamide permettant de révéler des protéines de 150 à 10 kDa environ. Les gels ont été colorés au bleu colloïdal G250 et analysés par le logiciel d'analyse d'image 2DE (ImageMaster, Amersham). Les profils électrophorétiques des deux classes de tendreté ont été comparés pour chaque race. Une analyse statistique décrite dans Meunier *et al.*, (2004) a été utilisée. Elle est basée sur l'utilisation de la méthode SAM (*Significance Analysis of Microarray*) qui

permet de quantifier et de valider statistiquement le rapport d'expression des protéines entre deux conditions A et B (ici les lots T+ et T-). Les protéines différentiellement exprimées entre les deux classes ont été identifiées par référence à la cartographie établie par Bouley *et al.*, (2004) (figure 2) et par spectrométrie de masse (MaldiTof) pour celles qui n'avaient pas été identifiées.

Figure 2 : cartographie du muscle Semitendineux selon Bouley *et al.*, (2004)

Les numéros correspondent aux protéines identifiées.



2. RESULTATS

L'analyse des notes moyennes de tendreté des différentes races (figure 1) montre que les valeurs sont les plus élevées pour la race Limousine, à la fois pour la note supérieure (7,45 vs 6,5 et 6,65 pour les races Charolaise et Salers respectivement) que pour la note inférieure (5,1 vs 4,15). Toutefois, l'écart entre les deux classes est similaire pour les trois races.

Les résultats de l'analyse protéomique révèlent 10 protéines différentiellement exprimées entre les deux classes de tendreté pour la race Charolaise (tableau 1). Seulement 5 protéines diffèrent entre les deux lots pour les races Limousine (tableau 2) et Salers (tableau 3).

En race Charolaise, sur 10 protéines, 6 correspondent à des protéines contractiles (MyBP-H, fTnT, sTnT, MLC1sa, MLC2-P, MLC2). Une autre est une protéine du métabolisme glycolytique : la Phosphoglucomutase (PGM). Une protéine est impliquée dans le cycle du calcium (la Parvalbumine, PV). La Hsp27 (*Heat Shock protein*) appartient à la famille des protéines chaperonnes de petite taille. Enfin, une dernière dont l'expression est augmentée dans la classe de tendreté supérieure n'a pas pu être identifiée suite à l'interrogation des bases de données protéiques à partir de son profil peptidique obtenu par spectrométrie de masse (Maldi-Tof). Cette protéine est également différentiellement exprimée dans la race Limousine (tableau 2). Elle est surexprimée dans le lot de tendreté supérieure pour les deux races. Des analyses complémentaires vont être effectuées pour pouvoir l'identifier.

Tableau 1 : protéines différentiellement exprimées dans la classe de tendreté supérieure pour la race Charolaise

Protéines/Numéro de spot	Différence d'expression
Parvalbumine, PV/117	+7,8
Myosin regulatory light chain 2, MLC2-P/136	+2,5
Slow troponin T, sTnT, low Mr/80	+2,3
Non identifiée, (pI5,4/8kDa)	+2,2
Myosin-binding protein H, MyBP-H/26	+2,1
Myosin light chain 1, MLC1sa/102	+2
Fast Troponin T, fTnT exon 17/73	+2
Phosphoglucomutase, PGM/32	-2
Myosin regulatory light chain 2, MLC2/136	-2,4
Heat shock protein 27, Hsp27/100 et 103	-2 et -2,7

En race Limousine (tableau 2), sur les 5 protéines différentiellement exprimées entre les deux classes de tendreté, 4 sont communes avec la race Charolaise. Seule l'expression différentielle de l'ACBP (protéine du métabolisme) ne se retrouve que pour les taurillons Limousins, avec toutefois une différence non significative en race Charolaise.

Tableau 2 : protéines différentiellement exprimées dans la classe de tendreté supérieure pour la race Limousine

Protéines/Numéro de spot	Différence d'expression
Parvalbumine, PV/117	+3,5
Non identifiée, (pI5,4/8kDa)	+2,5
Myosin-binding protein H, MyBP-H/ 23 et 26	+2 et + 2,3
Acyl-coA-binding protein, ACBP/	+2,2
Myosin regulatory light chain 2, MLC2/136	-2,1

En race Salers (tableau 3 et figure 3), sur les 5 protéines, seule l'expression différentielle de la Phosphoglucomutase (enzyme du métabolisme glycolytique) est commune aux races Charolaise et Salers. Elle est sous-exprimée dans les muscles de tendreté supérieure. De la même façon l'isoforme de LDH B (enzyme glycolytique) est sous exprimée dans le muscle ST de tendreté supérieure mais uniquement en race Salers. Là encore une protéine n'a pas pu être identifiée.

Tableau 3 : protéines différentiellement exprimées dans la classe de tendreté supérieure pour la race Salers

Protéines/Numéro de spot	Différence d'expression
Non identifiée, (pI 6,5/65 kDa)	+2,5
Lactate deshydrogenase B chain, LDH/77	-2,1
Heat shock protein p20/122	-2,1
Phosphoglucomutase, PGM/28, 30, 31, 32	-2,5; -2,9; - 2,8 ; -7,5
Sarcoplasmic reticulum 53 kDa glycoprotein, SR53G/56	-8

Figure 3 : protéine différentiellement exprimée dans le muscle ST des races Charolaise et Salers

Histogramme des volumes du spot différent entre les deux lots et image correspondante

T+ : tendreté supérieure, T- : tendreté inférieure

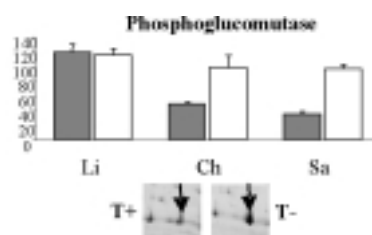
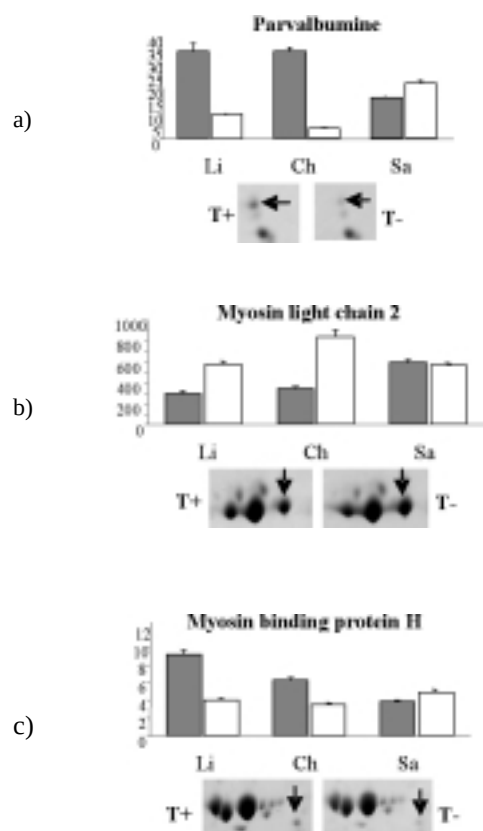


Figure 4 : protéines différemment exprimées dans le muscle ST des deux races à viande Charolaise et Limousine
Histogramme des volumes du spot différent entre les deux lots et image correspondante
T+ : tendreté supérieure, T- : tendreté inférieure



2. DISCUSSION

L'ensemble de ces résultats montre que les indicateurs potentiels de la tendreté de la viande bovine semblent différer entre les races à viande (Charolaise et Limousine) et la race rustique Salers. Ceci pourrait expliquer la tendreté supérieure généralement observée pour les races à viande. Cependant, peu de protéines apparaissent différentes entre les deux lots de tendreté. Si nous considérons les deux races à viande, quatre protéines apparaissent impliquées dans le déterminisme de la tendreté de la viande. L'expression de la Parvalbumine est fortement augmentée dans le lot de tendreté supérieure dans les deux races (figure 4a). Cette protéine possède des propriétés structurales qui lui procurent une forte affinité pour les ions calcium. Elle participe, particulièrement dans les fibres rapides, au cycle du calcium entre le cytoplasme et le réticulum sarcoplasmique (Berchtold *et al.*, 2000). D'autre part, la myosin light chain 2 (MLC2) dont l'expression est diminuée dans le lot de tendreté supérieure des deux races à viande (figure 4b) possède un site de fixation du calcium. Sa phosphorylation augmente son affinité pour le calcium (Szczena *et al.*, 2001). Dans le lot de tendreté supérieure, la MLC2 est plus phosphorylée, ce qui se traduit par une augmentation de la forme phosphorylée (MLC2-P) et une diminution de MLC2 (tableaux 1 et 2). Ces modifications sont plus marquées en race Charolaise. Ainsi, les protéines du cycle du calcium semblent fortement impliquées dans la tendreté de la viande. Etant donné le rôle important du calcium au cours de la

maturation, ces résultats semblent tout à fait cohérents. Dans la même logique, l'expression de l'Acyl-coA-binding protein est augmentée dans le lot de tendreté supérieure chez les races à viande, mais de manière significative uniquement en race Limousine (tableau 2). Cette protéine a un rôle primordial dans le métabolisme de l'acyl-coA. Un des rôles du complexe Acyl-coA / ACBP est de réguler le relargage d'ions calcium par le réticulum sarcoplasmique en augmentant l'activité des canaux calciques (Fulceri *et al.*, 1997). Ce processus doit être actif au cours du cycle *post-mortem* du calcium.

Concernant les deux autres protéines différemment exprimées dans les muscles de tendreté supérieure des races à viande, il nous est plus difficile de conclure. Peu de données bibliographiques concernant la *Myosin-binding protein* (figure 4c) sont disponibles pour le moment. Enfin, la protéine non identifiée dont l'expression est fortement augmentée dans le lot de tendreté supérieure chez les deux races à viande, demande à être étudiée plus amplement. Son identification requiert l'utilisation de la spectrométrie de masse MS/MS du fait de sa petite taille (8 kDa).

CONCLUSION

Cette première étude montre que l'analyse protéomique peut être utilisée pour mettre en évidence des indicateurs de la tendreté de la viande. Toutefois, il apparaît que très peu de protéines diffèrent entre les deux classes de tendreté dont l'écart est d'environ 2,5 points sur la note de tendreté. Seulement 10 protéines sur environ 400 analysées apparaissent différemment exprimées. Parmi les protéines identifiées, une majorité correspond à des protéines de l'appareil contractile et du métabolisme du calcium. Ces résultats préliminaires vont être complétés d'une part en utilisant en complément une séparation des protéines par E2D en gradient de pH basique (7-11) en première dimension. Ainsi, l'association des deux types de gels permettra de révéler des protéines musculaires de points isoélectriques variant de 4 à 11 unités pH. D'autre part, l'utilisation d'un plus grand nombre d'échantillons permettra de valider ces premiers résultats.

Ce travail a bénéficié d'un soutien financier de la FNADT.

Berchtold M.W., Brinkmeier H., Muntener M., 2000. *Physiol. Rev.*, 80, 1215-1265

Bouley J., Chambon C., Picard B., 2004. *Proteomics*, 4 (6), 1811-1824

Drandsfield E., Martin J.F., Bauhart D., Abouelkaram S., Lepetit J., Culioli J., Jurie C., Picard B., 2003. *Anim. Sci.*, 24, 47-56

Fulceri R., Knudsen J., Giunti R., Volpe P., Nori A., 1997. *Biochem. J.*, 325, 423-428

Meunier B., Bouley J., Pic I., Bernard C., Picard B., Hocquette J.F., 2004. *Proceedings du Congrès de Protéomique Toulouse Octobre 2004*

Picard B., Abouelkaram S., Bauhart D., Culioli J., Drandsfield E., Jurie C., Jailler R., Lepetit J., Listrat A., Martin J.F., Ouali A., Geay Y., 2001. *Rapport final du projet FNADT "Caractéristiques musculaires et qualités des viandes des races bovines allaitantes du Massif Central"*, 54 pages

Szczena D., Ghosh D., Li Q., Gomes A.V., 2001. *J. Biol. Chem.*, 276, 7086-7092