

**MUGENE : APPROCHE COMBINÉE DE GÉNÉTIQUE, DE GÉNOMIQUE ET DE BIOLOGIE MUSCULAIRE POUR PRÉDIRE LA QUALITÉ DE LA VIANDE BOVINE**

HOCQUETTE J-F.<sup>1</sup>, LAVILLE E.<sup>2</sup>, BERNARD C.<sup>3</sup>, PICARD B.<sup>1</sup>, CASSAR-MALEK I.<sup>1</sup>, SAYD T.<sup>2</sup>, LEPETIT J.<sup>2</sup>, JURIE C.<sup>1</sup>, MEUNIER B.<sup>1</sup>, MICOL D.<sup>1</sup>, LEVEZIEL H.<sup>4</sup>, RENAND G.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> INRA, UR1213, Unité de Recherches sur les Herbivores, <sup>2</sup> INRA, UR370, Unité Qualité des Produits Animaux, Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, <sup>3</sup> Institut de l'Élevage, Service Aptitudes et Sélection des Races Allaitantes, 149 rue de Bercy, 75975 Paris Cedex 12, <sup>4</sup> INRA-Université de Limoges, UMR1061, Unité de Génétique Moléculaire Animale, 123 Avenue Albert Thomas, 87060 Limoges, <sup>5</sup> INRA, UR337, Station de Génétique Quantitative Appliquée, 78352 Jouy-en-Josas cedex.

## Introduction

Afin de favoriser la production de viande bovine de qualité, les objectifs du projet MUGENE (les GENES du MUSCLE) sont (i) de déterminer le profil d'expression des gènes et des protéines associé à la production d'une viande de bonne qualité en fonction du potentiel de croissance musculaire des animaux et des facteurs d'élevage, et (ii) de découvrir de nouveaux marqueurs moléculaires ou des gènes polymorphes qui contrôlent la qualité de la viande. Le programme MUGENE s'inscrit donc dans une démarche intégrative du gène à la qualité de la viande en passant par le tissu musculaire et l'animal entier (Hocquette et al., 2006).

## Matériel et Méthodes

Ce projet s'appuie sur une expérimentation conduite par la Station de Génétique Quantitative et Appliquée (SGQA) en race Charolaise dans laquelle les descendants mâles sont engraisés selon deux systèmes de production différents (jeunes taurillons vs bœufs). Ce dispositif comporte un nombre réduit de familles divergentes sur leur potentiel de croissance musculaire. L'étude porte sur un effectif d'environ 110 animaux (taurillons abattus à l'âge de 15 ou 19 mois ou bœufs abattus à l'âge de 30 mois). Le protocole a été présenté en détails par Hocquette et al. (2006).

Les analyses du transcriptome (muscles prélevés à l'abattage) et du protéome (muscles prélevés à l'abattage [J0] puis après 5 jours [J5] et 21 jours [J21] de maturation) ont été réalisées sur les échantillons des animaux qui divergent par leur potentiel de croissance musculaire ou par la vitesse de maturation, la force de cisaillement et l'analyse sensorielle de leur viande pour découvrir de nouveaux marqueurs moléculaires associés à ces critères.

Les analyses du transcriptome des muscles *Longissimus thoracis* (LT) et *Semitendinosus* (ST) ont été réalisées avec des MyoChips de la plate-forme Génopole Ouest (INSERM U533, Nantes). Les données ont été normalisées grâce à l'outil MADSCAN et les gènes différentiellement exprimés ont été mis en évidence par la méthode SAM ("Significance Analysis of Microarrays"). Des validations des différentiels d'expression ont été réalisées par RT-PCR en temps réel.

Pour l'analyse du protéome, des échantillons de muscle LT ont été classés sur la base des données de tendreté estimée par mesure mécanique (force de cisaillement Warner-Bratzler sur des échantillons cuits au grill). Huit taurillons ayant produit les viandes les plus tendres (n=4) ou les plus dures (n=4) ont été retenus. Pour les muscles prélevés à l'abattage, les protéines ont été extraites et séparées par électrophorèse bidimensionnelle à raison de trois gels par animal.

Les analyses protéomiques ont été poursuivies au cours de la maturation (J0, J5 et J21). Afin d'augmenter la sensibilité de détection, les protéines sarcoplasmiques ont été séparées des protéines myofibrillaires sur la base de leur différence de solubilité. Ces deux fractions ont été analysées indépendamment par électrophorèse bidimensionnelle.

Dans tous les cas, l'analyse des spots a été réalisée par classification hiérarchique (Permutmatrix) et analyse statistique (ANOVA notamment). Les protéines d'intérêt ont été identifiées par spectrométrie de masse (Maldi-Tof) sur la Plateforme "Exploration du Métabolisme : des gènes aux métabolites" (atelier Protéome) de l'INRA de Clermont-Theix.

## Résultats

L'analyse du transcriptome du muscle LT de 25 taurillons Charolais a permis de mettre en évidence 58 gènes différentiellement exprimés à la fois selon la tendreté, la jutosité et la flaveur de la viande. Parmi ces gènes, plusieurs apparaissent corrélés à la jutosité et à la flaveur des viandes tel que le gène PRKAG1, d'autres sont plutôt liés à la tendreté, en particulier le gène DNAJA1 (Bernard et al. 2007). L'expression de ce gène présente une forte corrélation négative avec la tendreté, expliquant à elle seule jusqu'à 43% de sa variabilité. Cette relation a été confirmée avec des muscles de 23 bœufs (Bernard et al. 2008). Ces résultats ont donné lieu à un dépôt de brevet (Bernard et al. 2006).

La sélection génétique en faveur du potentiel de croissance semble plutôt associée à des modifications de l'expression des gènes impliqués dans les voies métaboliques contrôlant l'hypertrophie musculaire et le métabolisme énergétique (glycolyse et cycle de Krebs). De plus, l'expression différentielle de certains gènes semble être associée au développement de la masse musculaire indépendamment du dépôt de gras. Cependant, aucun de ces gènes n'est relié aux qualités sensorielles suggérant que la sélection génétique en faveur du potentiel de croissance ne modifie pas ou peu la qualité de la viande.

Les analyses transcriptomiques réalisées à partir d'échantillons du muscle ST mettent en évidence un grand nombre de gènes différentiellement exprimés entre les groupes extrêmes selon la dureté de la viande et le potentiel de croissance de ces mêmes animaux. Les analyses de corrélations sont actuellement en cours. Parmi ces gènes, 120 présentent des profils d'expression semblables à ceux observés pour le muscle LT, 61 étant associés à la tendreté et 59 au potentiel de croissance. Si les deux muscles de l'étude présentent des caractéristiques métaboliques différentes, plusieurs gènes associés à la tendreté de la viande et au potentiel de croissance ont des profils d'expression similaires.

L'analyse du protéome du muscle LT à l'abattage a montré que les protéines les plus exprimées dans le lot de tendreté inférieure correspondent à des protéines caractéristiques du type rapide glycolytique (par exemple une isoforme de Troponine T rapide, la phosphoglucomutase à 15 mois et des isoformes rapides de chaînes lourdes de myosine, et enfin la glycogène phosphatase, à 19 mois). Au contraire, les protéines les plus exprimées dans le lot de tendreté supérieure correspondent principalement au type lent oxydatif (par exemple apoBEC, apolipoprotéine, isoforme lente de chaîne lourde de myosine, ubiquinol-cytochrome-c réductase à 15 mois et chaîne bêta de l'ATP synthase à 19 mois). La protéine HSP 27 ("Heat Shock" Protéine impliquée dans les phénomènes d'apoptose) est plus exprimée dans le lot de tendreté inférieure aux deux âges. Ceci confirme le rôle important de cette protéine dans la tendreté mis en évidence dans d'autres études. De plus, trois protéines montrent une corrélation avec la tendreté estimée à la fois par analyse sensorielle et mesure mécanique. Ces résultats sont en cours de validation par la technique de western-blot afin de vérifier les différences entre lots et de confirmer l'utilisation de ces protéines comme marqueurs de tendreté. Ces études sont également en cours sur le muscle ST des mêmes animaux.

Dans le cadre des études de protéomique au cours de la maturation, l'analyse par classification hiérarchique a permis le classement des gels en fonction des temps post mortem. L'analyse a permis de distinguer des groupes de spots évoluant de façon corrélée au cours des trois temps post mortem (clusters 1, 2 et 3). Le cluster 1 regroupe des spots absents au temps J0 et présents aux temps J5 et J21. Ce sont des protéines entières appartenant initialement (J0) à la fraction soluble dont les augmentations d'intensité à J5 et J21 s'observent principalement dans la fraction non soluble. Ce résultat suggère une diminution de la solubilité des protéines au cours de la maturation. Le cluster 2 est constitué de spots uniquement présents au temps J21. Il s'agit de fragments protéiques issus de la protéolyse. Ces fragments sont répartis dans les deux fractions (soluble et insoluble). Les protéines du cluster 3, présentes à J0, sont absentes aux temps J5 et J21. Ce cluster est composé de onze protéines de la fraction soluble et deux protéines de la fraction non soluble. Ces diminutions d'intensité aux deux temps post mortem peuvent être dues à des phénomènes protéolytiques ou à une perte de solubilité des protéines ayant pour conséquence leur passage dans la fraction non soluble.

A J0, la comparaison des groupes produisant des viandes dures ou tendres a mis en évidence 25 spots différentiels. Les spots dont l'intensité est plus élevée dans le groupe des viandes dures correspondent principalement à des protéines du métabolisme glycolytique. Inversement, ceux dont l'intensité est plus élevée dans le groupe tendre correspondent à des protéines mitochondriales indiquant un métabolisme plus oxydatif. A J5 et J21, 22 et 14 spots respectivement ont une intensité différente en fonction de la tendreté. Ces différences s'observent surtout dans la fraction non soluble. Les muscles les plus tendres contiennent davantage de fragments protéiques de l'HSP27 et davantage d'une isoforme de l'HSP27 entière.

## Conclusion

Le projet MUGENE a permis d'identifier des gènes et des protéines associés aux caractéristiques musculaires et à la qualité de la viande, en particulier à sa tendreté. Toutefois, toutes les données de transcriptomique et de protéomique n'ont pas encore été dépouillées. A terme, l'ensemble de ces marqueurs de tendreté pourra être analysé simultanément par la technologie des puces à ADN (projet GENOTEND en cours) ou des puces à protéines (à l'aide d'anticorps spécifiques). Par ailleurs, les polymorphismes présents dans ces gènes sont en cours d'étude et leur impact sur la qualité de la viande pourra être étudié dans le cadre du dispositif QUALVIGENE.

## Références bibliographiques

- Bernard C., Cassar-Malek I., Hocquette J.F. 2006. Genomic marker for meat tenderness. Patent 06 300943.5. 12/09/06.  
Bernard C., Cassar-Malek I., Le Cunff M., Dubroeuq H., Renand G., Hocquette J.F. 2007. New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. *J Agric Food Chem*, 55: 5229-5237.  
Bernard C., Cassar-Malek I., Gentes G., Delavaud A., Dunoyer N., Micol D., Renand G., Hocquette J.F. 2008. Qualités sensorielles de la viande bovine : Identification de marqueurs génomiques. *Viandes Prod. Carnés Vol 26*, sous presse.  
Hocquette J.F., Morzel M., Levéziel H., Renand G., 2006. Mugène : approche intégrée combinant la génétique, la génomique et la biologie musculaire pour prédire la qualité de la viande bovine selon le potentiel de croissance des animaux et les facteurs d'élevage. *Viande et Produits Carnés, Hors série*, 125-126.

## Remerciements

L'expérimentation a été réalisée avec des animaux élevés et sélectionnés dans l'Unité expérimentale du Département de Génétique Animale à Bourges. Cette étude a bénéficié d'un soutien financier de l'ANR et d'APIS-GENE ainsi que du Commissariat à l'Aménagement et au développement économique du Massif central. Les auteurs remercient C Barboiron et C Chambon pour les analyses protéomiques ainsi que l'ensemble du personnel des installations expérimentales de Bourges, de l'abattoir de Theix et des laboratoires INRA (Theix, Jouy-en-Josas, Limoges) et INSERM (Nantes) concernés.