

ETUDE DU TRANSCRIPTOME DU MUSCLE POUR L'IDENTIFICATION DE GENES DETERMINANT LES CARACTERISTIQUES MUSCULAIRES ET LES QUALITES SENSORIELLES DE LA VIANDE BOVINE

K. SUDRE¹, I. CASSAR-MALEK¹, C. LEROUX¹, A. LISTRAT¹, C. JURIE¹, G. RENAND², P. MARTIN³, J.F. HOCQUETTE¹
INRA, ¹Unité de Recherches sur les Herbivores, Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle, ²Station de Génétique Quantitative et Appliquée, et ³Laboratoire de Génétique Biochimique et Cytogénétique, 78352 Jouy-en-Josas;

Introduction

La consommation de viande bovine a diminué d'environ 20% depuis 1985. Ceci s'explique en partie par la concurrence sévère des viandes blanches, par une mauvaise image de la viande bovine (crise de la "vache folle", etc...) et par l'insatisfaction que ressent le consommateur face à la grande variabilité, non maîtrisée, des qualités sensorielles de la viande. Celles-ci dépendent des conditions d'abattage et des procédés de transformation mais aussi des caractéristiques biologiques du muscle (fibres, tissu adipeux, trame conjonctive). Le mode d'élevage (vitesse de croissance, nutrition, âge) et le type génétique des animaux (race, etc...) sont d'une importance primordiale pour maîtriser ces caractéristiques musculaires et ainsi assurer aux consommateurs une viande aux qualités constantes et élevées [1]. Toutefois, le déterminisme des critères des qualités sensorielles de la viande est multifactoriel, et les caractéristiques musculaires analysées à ce jour n'expliquent pas complètement la variabilité de ces critères [2]. Aussi, notre principal objectif est-il de mettre en évidence de nouvelles caractéristiques musculaires explicatives de cette variabilité. En dehors de situations bien particulières (bovin culard, ...), les caractéristiques musculaires dépendent généralement de l'expression de nombreux gènes. La connaissance de ces gènes, de leurs profils d'expression et de leurs facteurs de régulation est donc nécessaire pour mieux orienter la sélection et optimiser les conditions d'élevage des bovins. En effet, il est important de préciser les relations entre le potentiel de croissance et les caractéristiques qualitatives du muscle pour rechercher le meilleur compromis en terme de sélection entre le développement musculaire et la qualité de la viande. De plus, dans le contexte de la crise récurrente touchant la filière bovine, il est essentiel de bien valoriser l'alimentation à base d'herbe, surtout dans le Massif Central où l'élevage et le pâturage tiennent une place socio-économique majeure. Nos objectifs sont donc : 1) d'identifier et d'analyser des gènes déterminant les caractéristiques musculaires et les qualités sensorielles de la viande, 2) de mettre en relation ces données avec des phénotypes divergents de potentiel de croissance, d'alimentation et de qualité des viandes, 3) d'en tirer des conséquences pratiques pour l'amélioration des schémas de sélection et des conditions d'élevage.

Matériel et méthodes

Schémas expérimentaux: Deux muscles (un muscle oxydatif, le *rectus abdominis* [RA] et un muscle glycolytique, le *semitendinosus* [ST]) d'animaux aux caractéristiques divergentes en terme de type génétique ou de conditions d'élevage sont étudiés dans deux modèles: (i) deux groupes extrêmes de six taurillons de 15-19 mois issus de deux lignées divergentes sélectionnées sur la base de leur potentiel de croissance (Dispositif Vachotron II) ; (ii) des bœufs de 30 mois recevant une alimentation soit à base d'herbe (n = 8) soit à base d'ensilage de maïs (n = 8). Dans les deux modèles, les caractéristiques biochimiques et métaboliques des muscles, et en particulier des fibres et de la trame conjonctive sont étudiées comme décrit par Listrat et al.[3].

Etude du transcriptome du muscle de bovin : Pour étudier le transcriptome du muscle de bovin nous avons, dans un premier temps, utilisé des filtres à haute densité sur lesquels étaient fixés 1339 fragments d'ADNc musculaires humains [4]. Dans un deuxième temps, nous avons produit un répertoire d'ADNc de muscles de bovin que nous avons fixé sur des lames de verre. Pour cela, une banque d'ADNc a été construite à partir d'un pool de muscles bovins oxydatifs ou glycolytiques prélevés à différents âges fœtaux ou post-nataux. Les ADNc ont été insérés de façon orientée dans un véhicule de clonage. De plus, 77 ADNc correspondant à des gènes importants pour la biologie du muscle ont été préparés individuellement par RT-PCR avec des amorces spécifiques. Pour l'établissement des profils expressionnels, nous avons extrait les ARN totaux de tous les échantillons (deux muscles par animal). Des pools représentatifs ont été constitués en mélangeant les ARN par muscle et par groupe d'animaux. Pour les hybridations sur lames, les ARN totaux ont été marqués par incorporation de Cy3-dCTP ou Cy5-dCTP lors de la rétrotranscription. Pour les hybridations sur membranes, les ARNm ont été purifiés, puis marqués par incorporation de [α^{33} P]dATP lors de la rétrotranscription.

Résultats

Caractéristiques des animaux et de leurs muscles :

Les taurillons à fort potentiel de croissance du dispositif Vachotron II ont un poids de muscle dans la carcasse 27% plus élevé et une proportion de tissu adipeux 28% plus faible que ceux présentant un faible potentiel de croissance ($P < 0.01$). Ils tendent à avoir des muscles moins oxydatifs (activité citrate synthase plus faible) sans modification des caractéristiques du collagène (Tableau 1).

Tableau 1 : Caractéristiques des muscles des deux lignées divergentes de taurillons

	Fort potentiel de croissance		Faible potentiel de croissance		SEM	Signification	
	RA	ST	RA	ST		Type	Muscle
^{a, b, c} ; $P < 0.05$							
Activité ICDH (oxydative), $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{g}$ frais	1.39 ^b	1.14 ^b	1.90 ^a	1.40 ^b	0.147	0.21	0.03
Activité CS (oxydative), $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{g}$ frais	1.98 ^c	2.52 ^{bc}	3.93 ^a	3.35 ^{ab}	0.293	0.004	0.95
Activité LDH (glycolytique), $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{g}$ frais	933 ^b	1176 ^a	900 ^b	1075 ^a	42.7	0.47	0.0006
Collagène total, μg OH-proline/mg poids sec	6.03	5.18	5.17	5.52	0.391	0.55	0.54
Solubilité du collagène (%)	25.3	23.1	24.1	17.1	4.600	0.38	0.33

Les bœufs au pâturage présentent des teneurs en collagène insoluble plus faibles dans le ST (-15%, $P < 0.05$) et un métabolisme musculaire plus oxydatif dans le RA (activités citrate synthase [CS] et isocitrate déshydrogénase [ICDH] 19-46 et 25-30% plus élevées respectivement ; $P < 0.05$) [3].

Etude du transcriptome : Les hybridations sur les filtres contenant des ADNc humains ont permis d'obtenir 1232 signaux d'hybridation dont plus de 500 exploitables et 344 retenus pour la comparaison du transcriptome entre les échantillons. Trente quatre gènes apparaissent différemment exprimés dans le RA et/ou le ST entre les taurillons à faible (-) ou fort (+) potentiel de croissance (Tableau 2). Les différentiels d'expression de certains de ces gènes sont en cours de validation par Northern-blot. L'implication de ces gènes dans les mécanismes déterminant les critères des qualités de la viande reste à préciser.

Tableau 2 : Exemple de gènes différemment exprimés entre les deux types génétiques	ratio -/+
thyroid hormone receptor interacting protein 10 (TRIP10)	50.8
annexin A5 (lipocortin 5, endonexin 2)	18.7
LIM protein	11.4
sarcosin	7.2
titin	4.1
heat shock protein 90a (hsp90a)	3.6
tumor suppressor involved in B-CLL (LEU5)	1.7
protein phosphatase 1, subunit 12B, myosin phosphatase target subunit 2	0.6
NADH dehydrogenase Fe-S protein 3	0.6

Sur les 1440 clones séquencés de la banque d'ADNc construite, 1019 correspondent à des séquences exploitables appartenant à plusieurs grandes familles : gènes mitochondriaux (133), gènes spécifiant des protéines ribosomales (100), etc... Un total de 353 ADNc issus de cette collection a été retenu ainsi que 77 ADNc spécifiquement amplifiés par RT-PCR pour créer un répertoire de 430 ADNc. Ce dernier a été déposé sur lames de verre et hybridé avec des ARN issus des muscles des taurillons à fort (+) ou faible (-) potentiel de croissance. En moyenne, 60% des signaux d'hybridation obtenus sont supérieurs à 2 fois le bruit de fond, indiquant que ce répertoire constitue un premier outil spécifique utilisable pour l'étude du transcriptome du muscle de bovin. L'analyse du transcriptome des muscles des taurillons et des bœufs alimentés à l'herbe ou au maïs est en cours.

Conclusion et perspectives

Les résultats présentés ici, ayant principalement porté sur la mise en place de schémas expérimentaux sur animaux, sur l'utilisation de filtres à haute densité disponibles et sur la construction de collections d'ADNc correspondant à des gènes bovins, représentent une première étape importante sur la voie de l'analyse du transcriptome du muscle de bovin. Ils s'inscrivent dans une démarche qui vise à intégrer un maximum d'informations depuis le gène jusqu'au muscle, dans la perspective de mettre en évidence de nouvelles caractéristiques musculaires déterminantes pour les qualités sensorielles de la viande bovine. Ces nouvelles caractéristiques seront ultérieurement analysées par des approches biochimiques classiques et viendront compléter des recherches de polymorphismes (programme GEMQUAL) et des travaux en protéomique engagés par ailleurs à l'INRA.

Références : [1] Geay Y, Bauchart D, Hocquette JF, Culioli J. 2002. INRA Prod. Anim. 15, 37-52. ; [2] Renand G, Picard B, Touraille C, Berge P, Lepetit P. 2001. Meat Sci. 59, 49-60 ; [3] Listrat A, Jurie C, Cassar-Malek I, Bouhraoua L, Picard B, Micol D, Hocquette JF 2001. French-Polish Symposium. Paris (France), 25-26 Sept 2001. ; [4] Sudre K, Leroux C, Petit E, Renand G, Cassar-Malek I, Auffray C, Piétu G, Martin P, Hocquette JF, 2000. Viandes Prod. Carnés, Hors Série, 77-80.

Remerciements : Ces travaux ont été soutenus par le programme AGENAE (Analyse du GEnome des Animaux d'Eleveage). Les auteurs remercient le personnel du Domaine Expérimental du Pin au Haras et de l'abattoir pour la conduite et l'abattage des animaux, le personnel de l'URH et du LGBC pour les analyses, le laboratoire de C Auffray (CNRS, Villejuif) pour l'accès aux filtres à haute densité de muscles humains, et la Société DIAGNOGENE (plate-forme transcriptome de Clermont-Ferrand) pour l'amplification et le spottage des clones.