



Biomarqueurs des qualités sensorielles de la viande bovine : compréhension des mécanismes et prédiction

Mohammed Gagaoua

► To cite this version:

Mohammed Gagaoua. Biomarqueurs des qualités sensorielles de la viande bovine : compréhension des mécanismes et prédiction. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Frères Mentouri Constantine, 2015. Français. NNT : . tel-02795802

HAL Id: tel-02795802

<https://hal.inrae.fr/tel-02795802>

Submitted on 5 Jun 2020

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.

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Frères Mentouri Constantine
Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires
I.N.A.T.A.A.

N° Ordre :

N° Série :

Thèse

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences
Spécialité : Sciences Alimentaires

Biomarqueurs des qualités sensorielles de la viande bovine :
« Compréhension des mécanismes et prédiction »

Par M. Mohammed GAGAOUA

Soutenue le 16/12/2015

Devant le jury composé de :

Président :	Pr. Khelifi D.	Université Frères Mentouri Constantine – Algérie
Examineurs :	Pr. Madani K.	Université Abderrahmane Mira Bejaia – Algérie
	Pr. Djenane D.	Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou – Algérie
	Dr. Ouali A.	UR370, INRA-Theix, Clermont-Ferrand – France
	Dr. Amourache L.	INATAA, Université Frères Mentouri Constantine – Algérie
Rapporteurs :	Dr. Picard B.	UMRH1213, INRA-Theix, Clermont-Ferrand – France
	Pr. Boudjellal A.	INATAA, Université Frères Mentouri Constantine – Algérie

A la mémoire de mes grands-parents

Merci à tous ceux qui à chaque fois m'ont fait confiance quand il m'est arrivé de douter. Dans leurs yeux, j'ai lu tellement de reconnaissance que j'ai eu honte de ne pas pouvoir leur rendre toute cette affection.

Sommaire

Liste des publications et communications

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

Revue de littérature

Chapitre I. Le muscle squelettique et métabolisme énergétique

I.1. Le muscle : composition, structure et fonctions	3
I.2. Les fibres musculaires.....	4
I.2.1. Propriétés contractiles.....	4
I.2.2. Propriétés métaboliques	6
I.3. Protéines du tissu conjonctif	7
I.4. Lipides intramusculaires	8
I.5. Le métabolisme énergétique	9

Chapitre II. Transformation *post-mortem* du muscle en viande et rôle de l'apoptose

II.1. Transformation du muscle en viande.....	11
II.2. Evolution du pH <i>post-mortem</i>	13
II.3. Apoptose ou Mort Cellulaire Programmée (MCP).....	14
II.3.1. Définition.....	14
II.3.2. Rôle physiologique de l'apoptose	14
II.3.3. Autophagie et apoptose	15
II.3.4. Nécrose et apoptose	15
II.3.5. Les peptidases apoptogènes (les Caspases)	16
II.3.6. Schéma général de l'apoptose	17
II.3.6.1. La voie extrinsèque.....	18
II.3.6.2. La voie intrinsèque	18
II.4. Mise en place de l'apoptose post-mortem et conséquences	19
II.4.1. Signalisation de l'apoptose au niveau du muscle	20

II.4.2. Caspases et attendrissage des viandes	20
II.4.3. Calpaïnes et apoptose	21
II.4.4. Calcium (Ca ²⁺) musculaire et apoptose	22
II.4.5. Oxydation cellulaire et apoptose	22
II.4.6. Enzymes lysosomales et apoptose.....	23
II.4.7. Stress/protéines de stress et apoptose	23
II.4.8. Variation des espaces intra- et extracellulaires et Apoptose	24
II.5. Preuves de la mise en place de l'apoptose.....	25
II.5.1. Dégradation de l'actine.....	25
II.5.1.1. Actine et ses fonctions	25
II.5.1.2. Dégradation de l'actine et apoptose.....	26
II.5.1.3. Les peptidases apoptogènes (caspases) et clivage de l'actine	28
II.5.1.4. Dégradation de l'actine <i>post-mortem</i>	28
II.5.2. Externalisation des phosphatidylsérines.....	29
II.6. Inhibiteurs endogènes des protéases et la science de la viande.....	31
II.6.1. Bref aperçu sur les serpins	32
II.6.2. Les serpins dans le muscle.....	34

Chapitre III. Qualités sensorielles de la viande bovine et conséquences de sa variabilité

III.1. Qualités de la viande	36
III.2. La couleur.....	37
III.3. La tendreté.....	38
III.4. La flaveur	39
III.5. La jutosité.....	40
III.6. Facteurs de variation des qualités sensorielles de la viande.....	41
III.6.1. Facteurs de productions liées à l'animal	41
III.6.1.1. Age	41
III.6.1.2. Sexe	42
III.6.1.3. Race	42
III.6.2. Facteurs liés à l'alimentation	43
III.6.3. Facteurs technologiques	45
III.6.3.1. Transport et abattage	45
III.6.3.2. Conservation et durée de maturation de la viande	46
III.6.3.3. Cuisson	46

Chapitre IV. Biomarqueurs des qualités des viandes

IV.1. Définition des biomarqueurs	48
IV.2. Le « cycle » des biomarqueurs.....	49
IV.2.1. Phase de préparation	49
IV.2.2. Phase de recherche	49
IV.2.3. Phase de validation	50
IV.2.4. Phase d'implémentation ou de mise en place	50
IV.3. La stratégie protéomique.....	50
IV.3.1. Définitions du protéome et de la protéomique.....	50
IV.3.2. Stratégies d'identification des protéines	51
IV.3.2.1. Électrophorèse monodimensionnelle (1DE)	52
IV.3.2.2. Électrophorèse bidimensionnelle (2DE)	52
IV.3.2.3. Analyse des peptides par spectrométrie de masse et PMF.....	53
IV.4. L'analyse protéomique pour la découverte de biomarqueurs	54
IV.5. Applications des technologies de la protéomique à l'étude du protéome de la viande	57
IV.6. La protéomique et les modifications du protéome associées aux paramètres de la qualité de la viande.....	58
IV.6.1. La tendreté	58
IV.6.2. La couleur	61
IV.6.3. La capacité de rétention d'eau (CRE).....	63
IV.6.4. Autres qualités	64
IV.7. La protéomique pour comprendre les facteurs influençant les qualités de la viande...	64
IV.7.1. Modifications du protéome dues aux conditions pré-mortem	64
IV.7.1.1. Variabilité génétique	64
IV.7.1.2. Croissance musculaire.....	65
IV.7.1.3. Alimentation (régime alimentaire).....	65
IV.7.1.4. Conditions de manipulation pré-abattage des animaux	66
IV.7.2. Modifications du protéome dues aux facteurs <i>post-mortem</i>	67
IV.7.2.1. Modifications de l'expression des protéines du muscle lors du stockage	
IV.7.2.2. Modifications des protéines du muscle post-mortem dues aux traitements technologiques	69
IV.8. Liste non exhaustive de biomarqueurs de la qualité de la viande identifiés à ce jour .	70
IV.8.1. Biomarqueurs de la famille des protéines de choc thermique	71

IV.8.2. Biomarqueurs appartenant à la voie du stress oxydatif et détoxification	74
IV.8.3. Biomarqueurs appartenant au métabolisme énergétique	76
IV.8.3.1. Voie énergétique glycolytique	76
IV.8.3.2. Voie énergétique oxydative.....	77
IV.8.4. Biomarqueurs des protéines du cytosquelette et protéolyse	78
IV.8.5. Biomarqueurs impliqués dans les voies de transport, de signalisation et d'apoptose	80
Objectifs de la thèse.....	81
Méthodologie et dispositif expérimental	83
I. Dispositif expérimental.....	83
II. Prélèvements des muscles	84
III. Méthodes	85
III.1. Évolution du pH <i>post-mortem</i>	85
III.2. Mesure instrumentale de la couleur	86
III.3. Etude du type contractile par séparation électrophorétique des isoformes de chaînes lourdes de myosine.....	86
III.4. Dosage du collagène total et insoluble.....	88
III.5. Extraction et dosage des lipides totaux	89
III.6. Dosage de l'activité des enzymes du métabolisme glycolytique et oxydatif.....	89
III.6.1. Métabolisme Glycolytique.....	90
III.6.2. Métabolisme oxydatif	91
III.7. Evaluation de la qualité sensorielle de la viande	92
III.7.1. Evaluation sensorielle par un jury entraîné.....	92
III.7.2. Mesure instrumentale de la force de cisaillement de Warner-Bratzler.....	93
III.8. Quantification des biomarqueurs par Dot-Blot	94
III.8.1. Extraction des protéines et dosage Bradford	94
III.8.2. Liste des protéines biomarqueurs quantifiées par Dot-Blot	94
III.8.3. Validation de la spécificité des anticorps par Western-Blot.....	95
III.8.4. Quantification proprement dite par la technique du Dot-Blot	96
III.9. Analyses statistiques	98
III.9.1. Normalité des variables et standardisation des données.....	98
III.9.2. Analyses de variance et comparaison multiples de moyennes	99

III.9.3. Analyses de covariance.....	100
III.9.4. Régression multiple	101
III.9.5. Analyse de corrélations de Pearson	103
III.9.6. Analyse en Composantes Principales	104
Résultats de la thèse	106
Publication n°01	107
Supplément publication n°01	110
Publication n°02	112
Publication n°03	115
Supplément publication n°03	118
Publication n°04	120
Supplément 1 publication n°04	123
Supplément 2 publication n°04	125
Publication n°05	127
Publication n°06	130
Publication n°07 en cours.....	134
Discussion générale	138
Conclusion et perspectives.....	157
Références bibliographiques	159

Liste des publications et communications

Liste des publications et communications

1. Publications scientifiques

1. **Gagaoua M.**, Boudida Y., Becila S., Picard B., Boudjellal A., Sentandreu M.A. & Ouali A. (2012). New Caspases' inhibitors belonging to the serpin superfamily: A novel key control point of apoptosis in mammalian tissues. *Advances in Bioscience and Biotechnology* **03**, 740-50. **IF: 0.73**
2. Ouali A., **Gagaoua M.**, Boudida Y., Becila S., Boudjellal A., Herrera-Mendez C.H. & Sentandreu M.A. (2013). Biomarkers of meat tenderness: present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanisms involved. *Meat Sci* **95**, 854-70. **IF: 2.615**
3. Picard B., **Gagaoua M.**, Micol D., Cassar-Malek I., Hocquette J.F. & Terlouw C.E. (2014). Inverse relationships between biomarkers and beef tenderness according to contractile and metabolic properties of the muscle. *J Agric Food Chem* **62**, 9808-18. **IF: 2.912**
4. **Gagaoua M.**, Claudia Terlouw E.M., Boudjellal A. & Picard B. (2015). Coherent correlation networks among protein biomarkers of beef tenderness: what they reveal. *J Proteomics* **128**, 365-74. **IF: 3.888**
5. **Gagaoua M.**, Hafid K., Boudida Y., Becila S., Ouali A., Picard B., Boudjellal A. & Sentandreu M.A. (2015). Caspases and Thrombin Activity Regulation by Specific Serpin Inhibitors in Bovine Skeletal Muscle. *Appl Biochem Biotechnol* **177**, 279-303. **IF: 1.735**
6. **Gagaoua M.**, Terlouw E.M., Micol D., Boudjellal A., Hocquette J.F. & Picard B. (2015). Understanding Early Post-Mortem Biochemical Processes Underlying Meat Color and pH Decline in the Longissimus thoracis Muscle of Young Blond d'Aquitaine Bulls Using Protein Biomarkers. *J Agric Food Chem* **63**, 6799-809. **IF: 2.912**
7. **Gagaoua, M.**, Micol, D., Picard, B., Terlouw, E.M.C., Moloney, A.P., Juin, H., Meteau, K., Boudjellal, A., Scollan, N.D., Richardson, R.I., & Hocquette J.F. (AAAA). Effect of end-point temperature during cooking on beef sensory characteristics: likes and dislikes of French and UK panelists. *Meat Science*, **Revision**. **IF: 2.615**
8. **Gagaoua, M.**, Terlouw, E.M.C., Micol, D., Hocquette J.F., Moloney, A.P., Nuerenberg, K., Bauchart, D., Boudjellal, A., Scollan, N.D., Richardson, R.I., & Picard, B. (AAAA). Differences and similarities in associations among muscle characteristics and sensory qualities of meat from eight different types of cattle. *Journal of Intergrative Agriculture*. **Revision**. **IF: 0.833**
9. **Gagaoua, M. et al.** (AAAA). Differences in the levels of bov-SERPINA3 inhibitors in beef steaks from the *Rectus abdominis* muscle with high or low shear force explain the variability in tenderness of Maine-Anjou breed. **En preparation**.

2. Communications scientifiques

Communications orales

- 10. Gagaoua M.,** Micol D., Hocquette J.F., Moloney A., Nuernberg K., Bauchart D., Scollan N., Richardson R.I., Boudjellal A. & Picard B. **(2013)**. Effect of diets on bovine muscle composition and sensory quality characteristics. In: Book of Abstracts of the 64th Annual Meeting of the European Federation for Animal Science, 26-30 of August, p. 567. *Wagening Academic Publishers*, Nantes, France.
- 11. Gagaoua, M.,** Terlouw, E.M.C, Boudjellal, A., & Picard, B. **(2014)**. Meat science and Foodomics: application of omics approaches to meat quality management. In: Séminaires International sur les Sciences Alimentaires, SISA. 14-16 Octobre, INATAA Constantine, UC1, Algérie, CO 4. Pp. 59.
- 12. Gagaoua M.,** Terlouw C., Micol D., Boudjellal A., Hocquette J.F. & Picard B. **(2015)**. Proteomic biomarkers of meat colour of Blonde d'Aquitaine young bulls: towards a better comprehension of the biological mechanisms. In: Proceedings of the 61th *International Congress of Meat Science and Meat Technology*, pp. 1-4, Clermont-Ferrand, France.
- 13. Gagaoua M.,** Terlouw E.M.C. & Picard B. **(2015)**. Using protein biomarkers to understand the biological mechanisms underlying beef sensory qualities. In: Book of Abstracts of the 4th *International Congress on Analytical Proteomics*, pp. 53-4. Proteomass, Caparica - Almada, Portugal.

Communications par affiches

- 14. Gagaoua, M.,** Boudjellal, A., Ouali, A., and Picard, B. **(2013)**. An overview of meat quality prediction using biomarkers: the role of omics technologies. *Les Journées Internationales de Biotechnologie de l'ATBiotech*, 21-24 Décembre, Hammamet – Tunisie, BIP 70. Pp 61
- 15. Gagaoua M.,** Boudjellal A., Becila S., Boudida Y., Herrera-Mendez C.H., Sentandreu M.A. & Ouali A. **(2013)**. Apoptosis regulation in postmortem muscle: cross-class inhibition of caspases by two bovine serpins. In: *Proceedings of the 59th International Congress of Meat Science and Technology*, p. 4, Izmir, Turkey.

- 16. Gagaoua M.,** Micol D., Richardson R.I., Hocquette J.F., Terlouw E.M.C., Meteau K., Juin H., Moloney A.P., Nuernberg K., Scollan N.D., Boudjellal A. & Picard B. **(2013).** Relationships between overall liking score and sensory meat attributes in different types of beef cattle. In: *Proceedings of the 59th International Congress of Meat Science and Technology*, p. 4, Izmir, Turkey.
- 17. Picard B., Gagaoua M.,** Kammoun M., Terlouw C., Hocquette J.F. & Micol D. **(2013).** Biomarkers of beef tenderness in young bulls of three breeds. In: *Proceedings of the 59th International Congress of Meat Science and Technology*, p. 4, Izmir, Turkey.
- 18. Gagaoua M.,** Durand D., Micol D., Santé-Lhoutellier V., Terlouw C., Ellies-Oury M.P., Boudjellal A., Hocquette J.F. & Picard B. **(2014).** Biomarkers of meat sensory qualities of Angus beef breed: towards the development of prediction equations. In: 15^{èmes} JSMTV, pp. 137-8. *Viandes & Produits Carnés*, Clermont-Ferrand.

Liste des figures

Figure 01. Composition du tissu du muscle squelettique.	3
Figure 02. Organisation du muscle squelettique.	3
Figure 03. Schéma représentatif de la structure du muscle et de la fibre musculaire.	4
Figure 04. Fibres des isoformes de chaînes lourdes de myosines	6
Figure 05. Principe de formation de la molécule de tropocollagène	7
Figure 06. Principe de la fibrillogenèse.....	7
Figure 07. Principales voies métaboliques musculaires	9
Figure 08. Etapes clés de la transformation du muscle en viande et phénomène d'apoptose.	11
Figure 09. Les trois voies de la mort cellulaire	15
Figure 10. Structure schématique des précurseurs des caspases	16
Figure 11. Schéma de maturation du précurseur de la caspase 3 en caspase 3 active.....	16
Figure 12. Voie de signalisation à Ca^{2+} mitochondriale.....	22
Figure 13. Organisation de l'actine dans le muscle strié.....	25
Figure 14. Schéma de l'asymétrie des phospholipides de la membrane plasmique.....	30
Figure 15. Structure d'une serpine	32
Figure 16. Mécanisme d'inhibition des serpins.....	33
Figure 17. Facteurs influençant les comportements des consommateurs	36
Figure 18. La myoglobine et la couleur de la viande	37
Figure 19. Patrimoine génétique et vécu influencent la résistance au stress.....	45
Figure 20. Illustration de l'évolution de la tendreté au cours de la maturation.....	46
Figure 21. Effet de la température de cuisson sur les propriétés sensorielles de la viande.....	47
Figure 22. Les techniques « omiques » et la science de la viande.	48
Figure 23. Identification de protéines marqueurs de la qualité de la viande.....	49
Figure 24. Principales étapes de l'analyse protéomique	51
Figure 25. Principe général de l'électrophorèse bidimensionnelle (2DE) et stratégie protéomique.....	52

Figure 26. Evolution de l'utilisation de la protéomique.....	55
Figure 27. Principe des biopuces à protéines	56
Figure 28. Stratégie protéomique appliquée sur les espèces bouchères.....	58
Figure 29. Principales familles biologiques regroupant la liste non exhaustive de biomarqueurs des qualités des viandes identifiés dans les études protéomiques lors des 15 dernières années.	70
Figure 30. Rôles potentiels des protéines de stress thermique dans le muscle <i>post-mortem</i> . .	71
Figure 31. Les différents volets de la thèse	82
Figure 32. Schéma récapitulatif du dispositif expérimental.....	83
Figure 33. Schéma du dispositif expérimental des taurillons.....	84
Figure 34. Diagramme illustrant l'échantillonnage du muscle <i>Longissimus thoracis</i>	86
Figure 35. Evaluation sensorielle de la viande.....	93
Figure 36. Principes du Western-Blot et du Dot-Blot	96
Figure 37. Analyse en composantes principales (ACP) des caractéristiques musculaires et qualités sensorielles.....	141
Figure 38. Schéma illustrant la relation entre les propriétés métaboliques et contractiles du muscle et les petites protéines de stress (small-Hsp) et la tendreté de la viande.	146
Figure 39. Diagramme de Venn du nombre de biomarqueurs corrélés significativement ($P < 0.05$) avec les paramètres de couleur (L^* , a^* , b^* et C^*) de la viande de la race Blonde d'Aquitaine.....	147
Figure 40. Schéma biologique hypothétique expliquant le rôle de Hsp70-1A/B et la μ -calpaine dans le développement de la couleur de la viande de la Blonde d'Aquitaine.....	148
Figure 41. Relation entre les biomarqueurs et la chute de pH.....	151
Figure 42. Schéma mécanistique intégratif de la majorité des biomarqueurs étudiés pour décrire les mécanismes susceptibles de gouverner les étapes de la transformation du muscle <i>post-mortem</i> en viande en relation avec le phénomène d'apoptose	154

Liste des tableaux

Tableau 01. Caractéristiques biologiques des principaux types de fibres musculaires.....5

Tableau 02. Revue non-exhaustive des approches de protéomique quantitatives les plus utilisées dans le domaine des sciences de la viande.....54

Tableau 03. Liste non exhaustive de marqueurs protéiques identifiés par analyse protéomique et associés à la variabilité de quelques paramètres de la qualité de la viande.....59

Tableau 04. Conditions de prélèvement et de conservation des échantillons85

Tableau 05. Liste des 18 biomarqueurs quantifiés en utilisant la technique du Dot-Blot et conditions d'utilisation de chaque anticorps94

Tableau 06. Analyse de variance de l'effet du régime alimentaire sur l'abondance des biomarqueurs étudiés..... 99

Introduction générale

Introduction générale

Les qualités sensorielles de la viande (couleur, tendreté, flaveur et jutosité) impactent fortement les préférences et les attentes des consommateurs (Dransfield *et al.*, 2003). La qualité de la viande est une composante complexe influencée par une multitude de facteurs qui interagissent entre eux. Il s'agit par exemple de la génétique, l'alimentation, la manipulation *pré-mortem* des animaux, la manipulation des carcasses *post-mortem*, les traitements technologiques et de leurs interactions (Rosenfold et Andersen, 2003; Lawrie et Ledward, 2006 ; Hocquette *et al.*, 2012 ; Jurie *et al.*, 2006). De plus, ces différentes qualités sensorielles sont dépendantes des caractéristiques musculaires de l'animal et des modifications biochimiques *post-mortem* (Ouali, 1990 ; Dransfield *et al.*, 2003). Ces caractéristiques dépendent d'une part, des propriétés contractiles et métaboliques des différents types de fibres qui composent les muscles squelettiques des bovins (Picard et Cassar-Malek, 2009) ; d'autre part, de la jonction de ces fibres à la trame conjonctive dont le collagène représente la composante protéique majeure (Dubost *et al.*, 2013). La transformation du muscle *post-mortem* en viande, période pendant laquelle s'élaborent les qualités sensorielles du produit final, prend en compte les évolutions de ces caractéristiques et des mécanismes qui y contribuent.

Pour la viande bovine, l'étude des caractéristiques musculaires présente donc un intérêt fort, puisque leurs propriétés sont impliquées dans le déterminisme de divers critères de la qualité de la viande tels que la tendreté, la jutosité, la flaveur, la couleur et le pH (Klont *et al.*, 1998 ; Maltin *et al.*, 2003 ; Pastsart *et al.*, 2013). Les effets de ces caractéristiques, en particulier sur la tendreté de la viande, sont influencés par des facteurs technologiques comme la température de cuisson (Tornberg, 2005). Ainsi, il apparaît clairement que la tendreté de la viande est très difficile à maîtriser en raison de son origine multifactorielle non totalement élucidée.

Par ailleurs, les études menées jusqu'à présent reflètent la difficulté de maîtriser et de prédire, à partir des caractéristiques musculaires, la qualité de la viande bovine. Ces études ont rapporté que les caractéristiques biochimiques du muscle expliquent au plus 30% des variations de la tendreté et autres qualités chez certaines races bovines (Keith *et al.*, 1985 ; Renand *et al.*, 2001 ; Chriki *et al.*, 2012 ; Bonny *et al.*, 2015).

Cette forte variabilité de la qualité non maîtrisée a conduit les chercheurs à utiliser des

outils à haut débit. Les techniques « omiques », notamment la protéomique, ont été proposées afin d'appréhender et comprendre le protéome du muscle *post-mortem* et les mécanismes biologiques associés aux différents critères de la qualité de la viande. Ces approches ont permis l'identification de biomarqueurs potentiels, qui sont à la fois explicatifs et prédictifs (Hocquette *et al.*, 2007 ; Guillemain *et al.*, 2011 ; Picard *et al.*, 2011 ; 2012 ; 2015 ; Te Pas *et al.*, 2011 ; D'Alessandro *et al.*, 2012 ; Ouali *et al.*, 2013). Cette alternative s'explique par le fait que les approches classiques d'étude des caractéristiques des muscles étaient basées sur un petit nombre de protéines et ne prenaient pas en compte la complexité et la multitude des mécanismes biochimiques mis en jeu et leurs interactions (Bendixen *et al.*, 2003 ; Picard *et al.*, 2010). Par ailleurs, les biomarqueurs de la qualité seraient le reflet des différentes voies métaboliques qui contribuent au développement des qualités de la viande.

Par conséquent, une meilleure compréhension de ces voies et de leurs interactions est une condition préalable pour une identification fiable de biomarqueurs. C'est dans cette optique que ma thèse de doctorat s'inscrit. Elle vise à apporter de nouvelles connaissances sur les mécanismes sous-jacents, en s'appuyant sur des données concernant les propriétés biologiques des muscles et les qualités sensorielles de la viande bovine. De plus, en utilisant une liste de biomarqueurs initialement validée pour la tendreté, ma thèse utilise une approche mécanistique afin d'apporter de nouvelles connaissances sur les mécanismes gouvernant certains critères de la qualité de la viande ceci sur plusieurs races bovines et plusieurs types de muscles, et de proposer ainsi les premières équations de prédiction.

Ce manuscrit de thèse comprend trois parties :

- Ξ Une revue bibliographique faisant l'état de l'art i) sur les caractéristiques du muscle squelettique, ii) la transformation *post-mortem* du muscle en viande et iii) ses qualités sensorielles, et iv) les techniques en « omiques » appliquées pour rechercher et identifier les biomarqueurs de la qualité de la viande ;
- Ξ La présentation de l'ensemble de mes résultats acquis durant mes quatre années de thèse , ceci sous forme d'articles en partant des qualités sensorielles et caractéristiques musculaires, pour aller vers l'utilisation des biomarqueurs pour la prédiction et l'explication des ses différentes qualités, et en final aborder par une approche mécanistique les phénomènes qui gouvernent la transformation du muscle *post-mortem* en viande et l'élaboration des différentes qualités de la viande bovine ;
- Ξ Une discussion générale au cours de laquelle seront également présentées les perspectives de ce travail.

Revue de littérature

Chapitre I

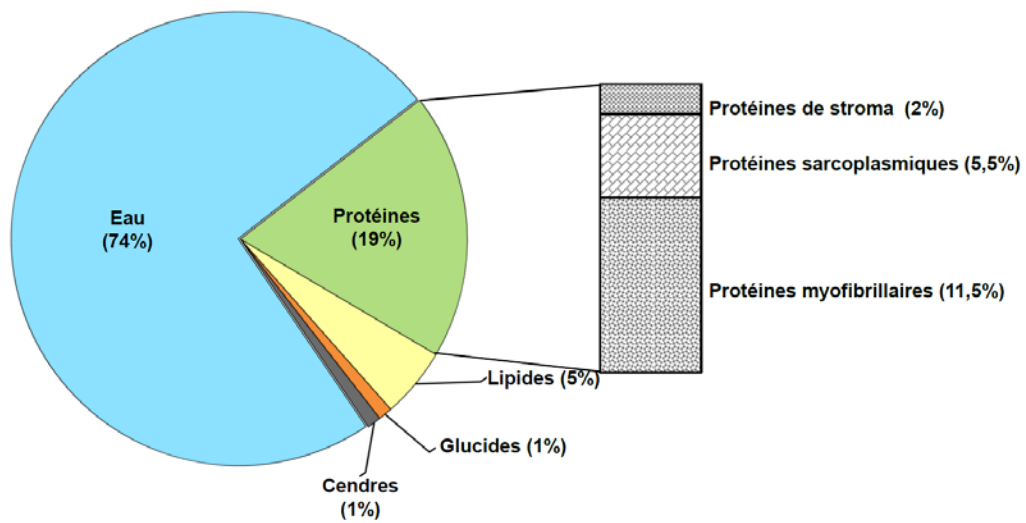


Figure 01. Composition du tissu du muscle squelettique.

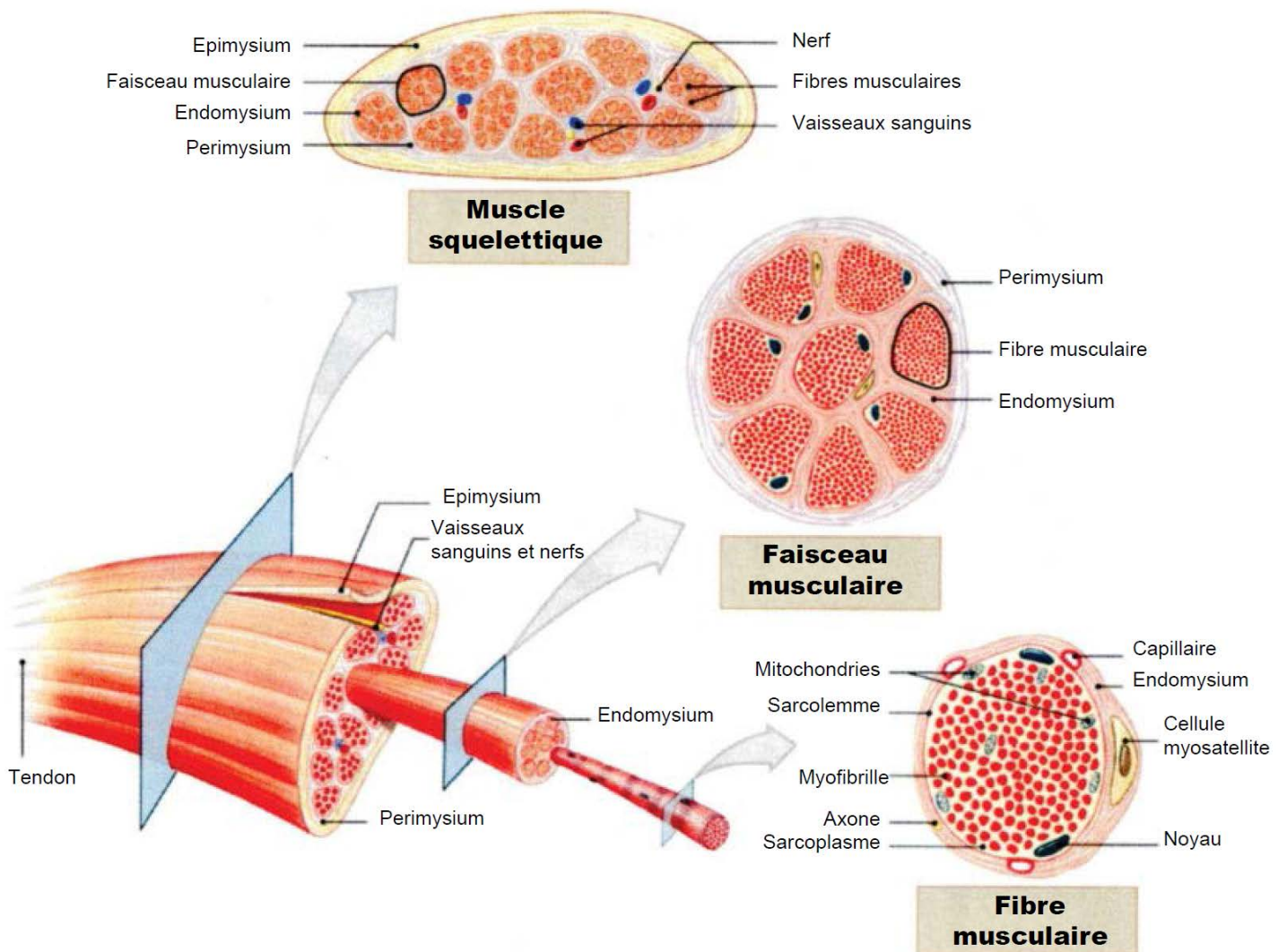


Figure 02. Organisation du muscle squelettique (adapté de [Brandebourg, 2013](#))

Chapitre I

« Le muscle squelettique et métabolisme énergétique »

I.1. Le muscle : composition, structure et fonctions

Le muscle est le constituant principal de la carcasse des animaux de boucherie ; il représente 35 à 65% du poids vif de l'animal ([Brandebourg, 2013](#) ; [Listrat *et al.*, 2015](#)). Sa composition chimique est relativement constante. Chez l'animal adulte (Figure 01), le muscle squelettique est essentiellement composé d'eau (environ 74 %) et de protéines (environ 19%) et en plus faible quantité de lipides (1 – 6%) et de glucides (1%) ([Smulders *et al.*, 2014](#)).

L'eau sert dans la thermorégulation, dans de nombreux processus cellulaires et pour le transport des nutriments ([Lonergan *et al.*, 2010](#) ; [Smulders *et al.*, 2014](#)). Les protéines remplissent un grand nombre de fonctionnalités : maintien de la structure et de l'organisation du muscle, contraction musculaire, signalisation, dégradation/remodelage cellulaire. Les lipides jouent un rôle dans le stockage énergétique, les réponses immunitaires et les voies de reconnaissance cellulaire ([Lonergan *et al.*, 2010](#)). Enfin, le muscle est composé de constituants faiblement représentés (environ 1% du poids du muscle), parmi lesquels on trouve les glucides (le glycogène, majoritairement) et les cendres constitués de sels minéraux (notamment le fer, le zinc et le sélénium) ([Lawrie et Ledward, 2006](#)). Outre les oligo-éléments, la viande apporte des vitamines liposolubles A et E et des vitamines hydrosolubles du groupe B ([Lebret et Picard, 2015](#)).

Le muscle strié squelettique présente une structure biologique très hétérogène ([Brandebourg, 2013](#)) et hiérarchisée (Figure 02). Il est principalement composé de faisceaux de cellules plurinucléées. Les fibres musculaires occupent 75 à 90 % du volume musculaire. Chaque fibre musculaire est entourée par une enveloppe de tissu conjonctif : l'endomysium. Les faisceaux de fibres sont délimités par le périmysium. Enfin, le muscle est gainé par l'épimysium, enveloppe qui attache le muscle à l'os par le tendon. Ces différentes enveloppes ont un rôle moteur important. Chaque fibre est innervée par un nerf moteur et les nutriments nécessaires à la contraction sont apportés par des vaisseaux sanguins ([Brandebourg, 2013](#) ; [Smulders *et al.*, 2014](#) ; [Listrat *et al.*, 2015](#)). Les muscles squelettiques exercent un rôle fondamental dans l'organisme, ils produisent le mouvement par un mécanisme moléculaire utilisant de l'énergie : la contraction musculaire.

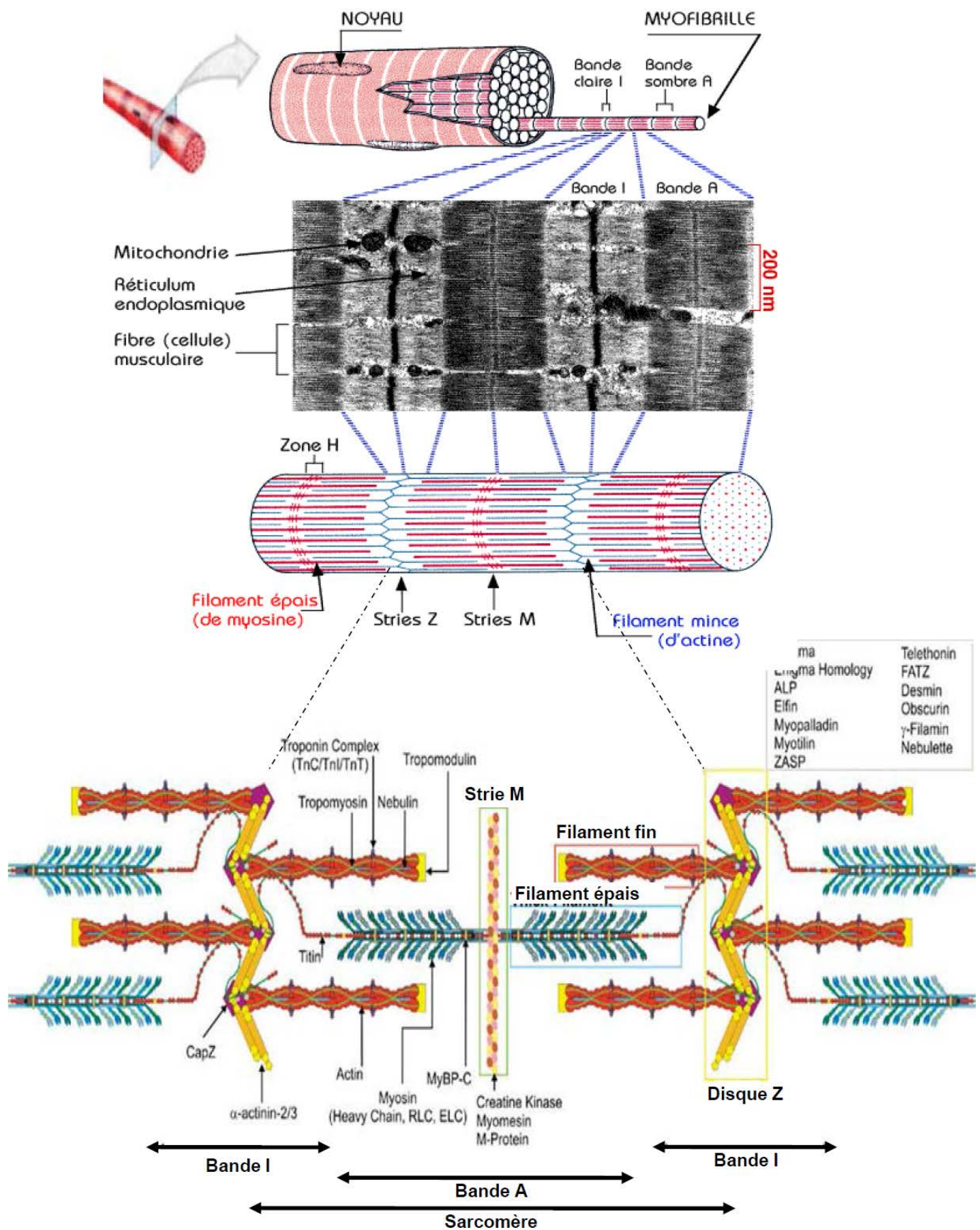


Figure 03. Schéma représentatif de la structure du muscle et de la fibre musculaire.

L'activité contractile est assurée par les fibres musculaires grâce à plusieurs protéines contractiles dont les plus importantes sont l'actine et la myosine (Figure 03). Le muscle a également un rôle métabolique puisqu'il constitue une véritable réserve de protéines et participe à l'équilibre de la balance énergétique au niveau du corps entier (Cortright *et al.*, 1997 ; Wolfe, 2006). Les muscles striés squelettiques, rattachés au squelette, sont impliqués dans les mouvements volontaires et permettent la locomotion et le maintien de la posture des animaux. Enfin, chez les animaux d'intérêt agronomique (espèces bouchères), le muscle est le tissu précurseur de la viande. Celui-ci subira en *post-mortem* différentes transformations biochimiques *post-mortem* conduisant au développement des qualités sensorielles de la viande (cet aspect est développé dans le chapitre II).

I.2. Les fibres musculaires

La fibre musculaire est une cellule plurinucléée, d'un diamètre compris entre 10 et 100 μm , et d'une longueur qui peut atteindre 60 cm. Elle est entourée par une membrane appelée sarcolemme et présente la particularité d'avoir un appareil contractile très spécialisé. Une grande majorité de l'espace intracellulaire, appelé encore sarcoplasme, est occupé par des myofibrilles pour environ 80% du volume de la cellule. La myofibrille est l'unité contractile du muscle. Elle est constituée de myofilaments (Figure 03). L'unité fonctionnelle des myofibrilles est appelée sarcomère; ce dernier se situe entre deux stries Z successives. Au sein de la myofibrille, les myofilaments forment une alternance de zones claires (bandes I) et foncées (bandes A) traduisant l'existence de deux sortes de filaments : les filaments fins constitués d'actine, de tropomyosine et de troponine et les filaments épais constitués de myosine (Figure 03). Les filaments d'actine sont présents de part et d'autre de la strie Z. La bande I correspond à la partie du sarcomère qui ne renferme que les filaments d'actine. La bande A correspond à la région où se chevauchent les filaments d'actine et de myosine. La région où l'on ne trouve que des filaments de myosine s'appelle la zone H. La partie centrale de la bande A constitue la ligne M, cette dernière se présente sous l'aspect d'un épaississement des filaments de myosine (Astruc, 2014a ; Listrat *et al.*, 2015).

I.2.1. Propriétés contractiles

Les principales protéines musculaires sont des protéines myofibrillaires impliquées dans l'appareil contractile, des enzymes participant au métabolisme cellulaire ainsi que la myoglobine, impliquée dans le stockage de l'oxygène et joue un rôle important dans la couleur de la viande. Parmi les protéines abondantes, on trouve l'actine (20 – 25%).

Tableau 01. Caractéristiques biologiques des principaux types de fibres musculaires
(d'après [Lefaucheur 2010](#) ; [Listrat et al., 2015](#)).

	I	IIA	IIX	IIB
Vitesse de contraction	+	+++	++++	+++++
ATPase myofibrillaire	+	+++	++++	+++++
Seuil d'excitation	+	+++	++++	+++++
Durée de travail par jour	+++++	+++	+++	+
Résistance à la fatigue	+++++	++++	++	+
Métabolisme oxydatif	+++++	++++, +++++	+, ++	+
Métabolisme glycolytique	+	++++	++++	+++++
Phosphocréatine	+	+++++	+++++	+++++
Glycogène	+	+++++	++++	+++++
Triglycérides	+++++	++	+	+
Phospholipides	+++++	++++	+++	+
Vascularisation	+++++	++++	++	+
Myoglobine	+++++	+++	+, ++	+
Pouvoir tampon	+	++++	+++++	+++++
Epaisseur strie Z	+++++	+++	+++	+
Diamètre	++	+, ++	++++	+++++

Le signe (+) indique respectivement :

- + : Très faible;
- ++ : Faible ;
- +++ : Moyen ;
- ++++ : Elevé ;
- +++++ : Très élevé.

C'est une protéine globulaire dont le poids moléculaire est d'environ 43 kDa (une chaîne polypeptidique de 376 acides aminés). La myosine, une autre protéine majoritaire du muscle constituant les myofilaments épais, représente 48% des protéines myofibrillaires totales. C'est une protéine dimérique de poids moléculaire d'environ 470 kDa et comprend deux longues chaînes de structure fibreuses qui se terminent par des têtes globuleuses (chaînes lourdes, MyHC, de PM 200 kDa) auxquelles sont associées des chaînes légères (MyLC) beaucoup plus courtes au nombre de deux par MyHC (leur PM étant compris entre 16 et 18 kDa).

Il existe plusieurs isoformes de chaînes lourdes de myosine (MyHC): myosine E (embryonnaire), F (néonatale ou fœtale), I (lente) et IIa, IIb ou IIx (rapide) (Lefaucheur, 2010). La myosine a deux propriétés importantes pour la contraction : d'une part, elle possède une propriété ATPasique qui est activée par les ions calcium et d'autre part, elle se lie à l'actine pour former un complexe: l'actomyosine. La myosine prédominante au sein d'une fibre détermine le type de fibre parmi les types lents (I), rapides oxydo-glycolytiques (IIa) ou rapides (IIb ou IIx) (Tableau 01).

La mesure (Figure 04) de l'activité ATPasique de la myosine (Brooke et Kaiser, 1970) ou la séparation des isoformes des chaînes lourdes de myosines par la technique d'électrophorèse permettent de distinguer les propriétés contractiles des fibres musculaires et de les classer (Talmadge *et al.*, 1993 ; Schiaffino et Reggiani, 2011 ; Picard *et al.*, 1999 ; 2011). Les fibres de type I (lentes) et celles de type IIa, IIX et IIB (rapides) expriment respectivement les isoformes MyHC I, et IIa, IIx et IIb (Figure 04). L'immunohistochimie permet également de distinguer des fibres hybrides en particulier les fibres IIC qui contiennent à la fois les isoformes MyHC I et IIa (Meunier *et al.*, 2010 ; Astruc, 2014b).

Les isoformes de MyHC sont mises en place au cours de développement musculaire selon une cinétique particulière. Chez le bovin, les isoformes embryonnaires et fœtales de MyHC disparaissent progressivement au cours du 3^{ème} trimestre de vie fœtale. A partir du deuxième trimestre de la vie fœtale, les isoformes rapides adultes (IIa et IIx) remplacent progressivement les isoformes développementales durant le dernier tiers de gestation (Robelin *et al.*, 1993 ; Picard *et al.*, 1994). Trois semaines après la naissance, toutes les fibres ne contiennent plus que les isoformes de MyHC adultes (Duris *et al.*, 1999). Enfin, les fibres musculaires sont des structures dynamiques qui peuvent passer d'un type à l'autre selon le schéma de plasticité $I \leftrightarrow IIa \leftrightarrow IIX \leftrightarrow IIB$ (Figure 4A). Un résumé des propriétés des différents types de fibres dans le muscle de mammifère est présenté dans le Tableau 01.

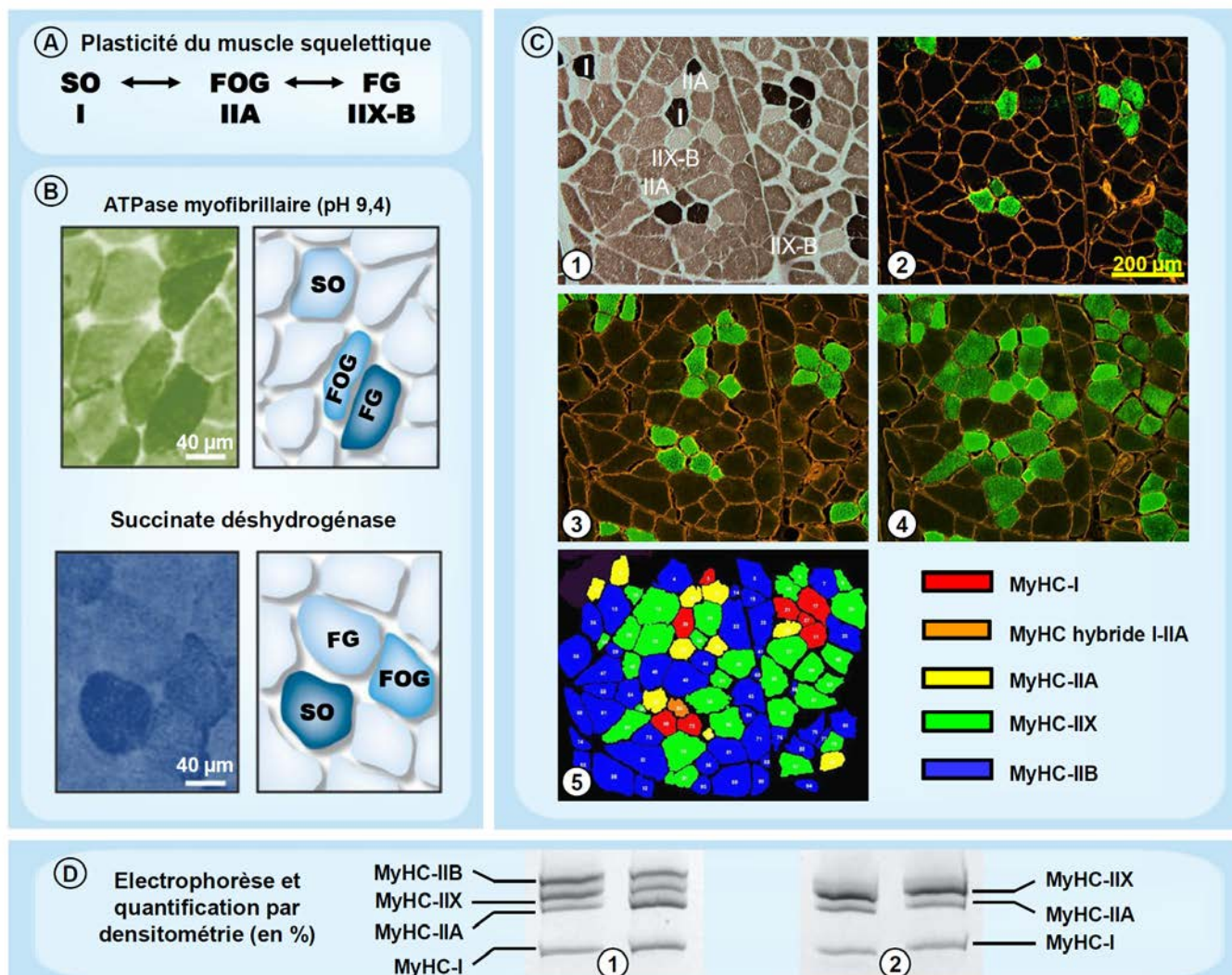


Figure 04. Fibres des isoformes de chaînes lourdes de Myosines (MyHC : *Myosin Heavy Chains*).

A) Plasticité du muscle squelettique en illustrant la transition dans les différents types de fibres musculaires (MyHC-I (SO, lentes oxydatives); MyHC-IIa (FOG, rapides oxydolytiques) et MyHC-IIx/b (FG, rapides glycolytiques)).

B) Coloration histologique des fibres SO, SOG et FG en utilisant l'activité ATPase myofibrillaire à pH 9.4 ou la coloration mitochondriale par l'activité de la succinate déshydrogénase.

C) Identification immunohistologique des fibres (Astruc, 2014b): **(1)** Activité ATPase après incubation à pH 4.45 ; **(2, 3, 4)** Immuno-histofluorescence par la double coloration de la laminine (orange) et myosines (vert). **(2)** Anticorps BAD5 reconnaissant et colorant l'isoforme MyHC-I. **(3)** Anticorps BF35 reconnaissant et colorant les isoformes de myosines MyHC-I + MyHC-IIa. **(4)** Anticorps SC71 reconnaissant et colorant les fibres MyHC-IIa (intense) et MyHC-IIx. **(5)** Image synthétique obtenue en combinant les coupes de chaque anticorps des images 2, 3 et 4. La technique d'immuno-histofluorescence est lourde à mettre en place, mais à l'inverse de l'immunohistologie, elle permet de discriminer les fibres IIX des fibres IIB et des hybrides contenant les deux isoformes.

D) Séparation des isoformes de fibres de myosines par SDS-PAGE et coloration au Bleu de Coomassie. La quantification des différents types de fibres s'effectuent par densitométrie et exprimée en pourcentage (%). **(1)** muscle contenant les quatre types d'isoformes et **(2)** muscle contenant trois isoformes de myosines.

Malgré la présence des transcrits, les trois isoformes de MyHC rapides adultes (les seules ayant fait l'objet de caractérisation dans cette thèse) ne sont pas présentes dans les muscles matures de toutes les espèces de mammifères. En effet, la MyHC IIB n'est pas exprimée chez le mouton et le cheval et a été mise en évidence chez certains bovins (Blonde d'Aquitaine) (Picard et Cassar-Malek, 2009) avec de fortes différences entre races.

I.2.2. Propriétés métaboliques

Les fibres musculaires sont aussi distinguées selon leur type métabolique (métabolisme oxydatif, oxydo-glycolytique, glycolytique). Il a été présenté ci-dessus qu'il existe deux types majeurs de fibres : les fibres oxydatives (fibres type I) et les fibres glycolytiques (fibres type II). La mesure des activités enzymatiques est souvent utilisée afin de déterminer le type métabolique des fibres musculaires. Les enzymes glycolytiques les plus couramment analysées sont la lactate déshydrogénase (LDH) et la phosphofructokinase (PFK). Les enzymes du métabolisme oxydatif sont plus nombreuses car représentatives de différentes voies métaboliques : **i)** l'hydrolyse des triglycérides circulants par la lipoprotéine-lipase (LPL) ; **ii)** le catabolisme des acides gras à chaîne longue jusqu'à l'acétyl-CoA (enzymes de la β -oxydation), **iii)** le cycle de Krebs (impliqué dans le catabolisme de l'acétyl-CoA produit à partir des acides gras ou du glucose) représenté par l'isocitrate déshydrogénase (ICDH) et la citrate synthase (CS) ou **iv)** de la chaîne respiratoire intervenant dans la synthèse d'énergie (représentée par la cytochrome-c oxydase : COX) (Jurie *et al.*, 2006).

La capacité oxydative des fibres musculaires a une relation inverse avec le diamètre de la fibre. En général, le diamètre des fibres de type I est le plus petit alors que les fibres de type IIB ont un diamètre le plus grand et les fibres de type IIA ont un diamètre intermédiaire (Cassens *et al.*, 1971).

Ainsi, la musculature d'un bovin est constituée de nombreux muscles différents dans leur forme, leur taille, leur fonction et leur métabolisme et représentant des pièces bouchères d'intérêt économique variable. La composition chimique et le métabolisme de chaque muscle sont importants car ils déterminent le métabolisme *post-mortem* du muscle et la qualité de la viande. Les études, portant sur le métabolisme musculaire et la qualité de la viande chez le bovin, utilisent généralement des muscles modèles caractérisant l'adaptation d'un type métabolique précis : souvent le muscle oxydo-glycolytique *Longissimus thoracis* et *lumborum* (entrecôte) ou le muscle glycolytique *Semitendinosus* (rond de gîte).

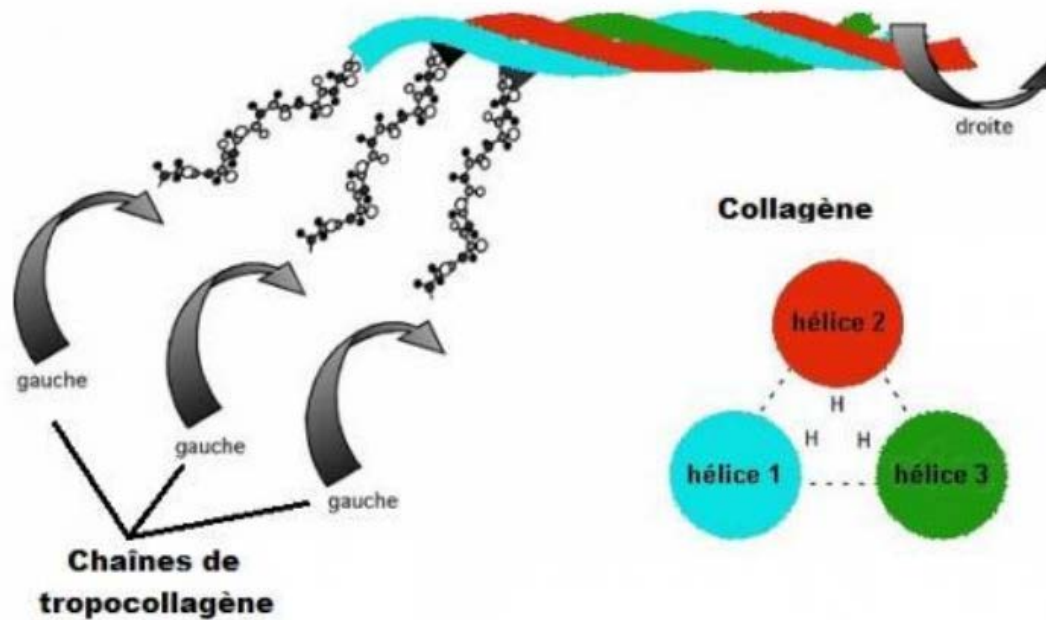


Figure 05. Principe de formation de la molécule de tropocollagène (tiré de [Dubost, 2012](#)).

Les trois chaînes polypeptidiques s'enroulent les unes autour des autres dans le sens inverse des aiguilles d'une montre. La cohésion du tropocollgène va être assurée par des liaisons hydrogènes.

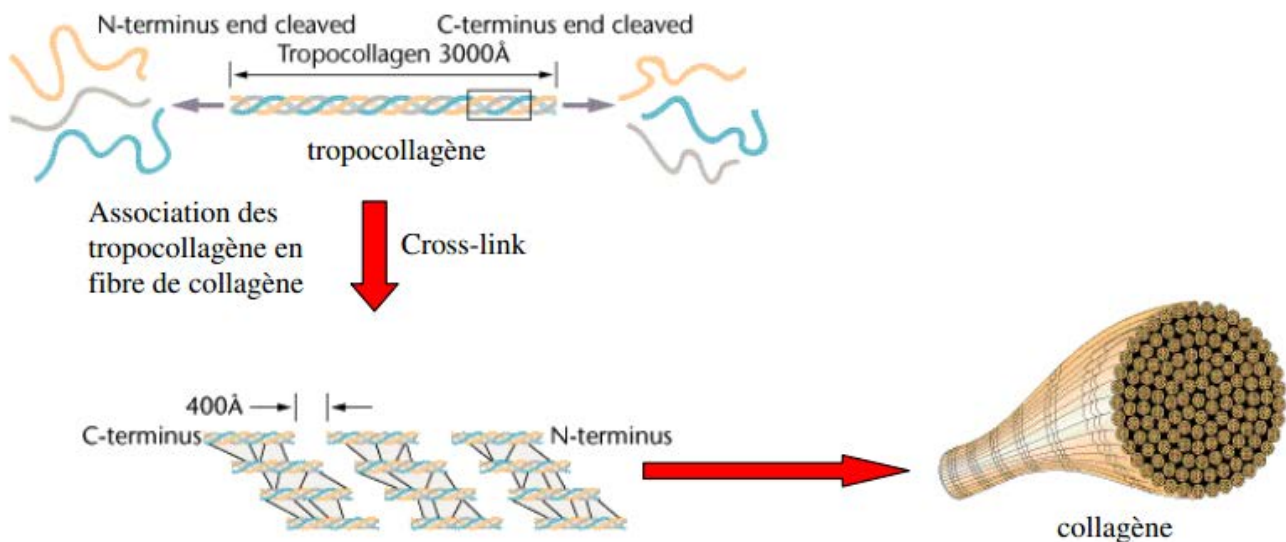


Figure 06. Principe de la fibrillogenèse (tiré de [Dubost, 2012](#)).

Les molécules de tropocollagène vont s'assembler pour former les fibrilles, qui vont elles-mêmes s'agréger pour former la molécule de collagène.

I.3. Protéines du tissu conjonctif

Le tissu conjonctif, distribué en trois enveloppes (épimysium, périmysium et endomysium) (Figure 02), est composé d'une matrice extra cellulaire (MEC) et de cellules (fibroblastes, adipocytes...etc.). La MEC est constituée majoritairement de molécules des familles des collagènes et des protéoglycanes, l'ensemble de ces molécules interagissant entre elles pour réaliser un réseau complexe qui va lui-même interagir avec les fibres musculaires (revue de (Astruc, 2014a ; Listrat *et al.*, 2015 ; Nishimura, 2015)). Le tissu conjonctif assure au muscle une grande résistance mécanique. Il est le tissu de soutien du système musculaire et intervient au niveau de la transmission des forces de la contraction myofibrillaire vers le squelette par l'intermédiaire des tendons. Il est impliqué directement dans le phénomène de tendreté de la viande. Il représente 3% de la masse musculaire et environ 10% des protéines musculaires totales. Les protéines de ce tissu sont essentiellement le collagène et l'élastine et sont insolubles quelle que soit la force ionique du milieu dans lequel elles se trouvent.

Le collagène représente 80% des protéines du tissu conjonctif. C'est l'une des rares protéines à contenir une proportion d'hydroxyproline. L'hydroxyproline représente 12 à 14% des acides aminés totaux du collagène. Son dosage permet d'évaluer la teneur en collagène des muscles (Etherington et Sims, 1981). Les collagènes sont une famille de glycoprotéines fibreuses. Quel que soit le type de collagène, la structure générale des molécules de collagène est une triple hélice polypeptidique, appelée tropocollagène. Les molécules de tropocollagène s'assemblent entre elles (3 hélices α et de 1050 acides aminés) par des liaisons covalentes pour former des fibrilles de 50 nm de diamètre (Figure 05).

Il possède un certain nombre d'acides aminés modifiés qui participent au pontage (liaisons de réticulation ou « *Cross-Links* ») entre les triples hélices de tropocollagène (Figure 06). Ces pontages assurent la force et la flexibilité des fibres. Cette structure lui donne une certaine rigidité mécanique qui, avec sa richesse en acides aminés hydrophobes, le rend insoluble dans l'eau. On distingue plusieurs types de collagène selon leur origine et leur composition. Les collagènes de types I, II et III se présentent sous forme de fibres. Le collagène de type I (80 à 160 nm de diamètre) est contenu dans toutes les structures conjonctives dans la peau, les os et les tendons. Le collagène de type II (< 80 nm de diamètre) est principalement retrouvé dans les tissus cartilagineux. Le collagène de type III est souvent majoritairement présent dans le périmysium, et souvent associé aux fibres de collagène de type I. Chez les mammifères, les collagènes fibrillaires de type I et III sont majoritaires (Bailey et Light, 1989).

Les autres composants principaux du tissu conjonctif sont les ProtéoGlycanes (PGs). Ce sont des molécules complexes et multifonctionnelles, constituées d'une protéine de poids moléculaire compris entre 40 et 350 kDa, liée par liaisons covalentes à plusieurs dizaines de chaînes de GlycosAminoGlycanes (GAGs) (Listrat *et al.*, 2015 ; Dubost *et al.*, 2013). Les PGs forment de grands complexes, en se liant à d'autres PGs ainsi qu'aux protéines fibreuses de la matrice (telles que le collagène). Ils lient les cations (sodium, potassium, calcium...) et l'eau, et régulent le mouvement des molécules à l'intérieur de la matrice (Praillet *et al.*, 1998).

L'élastine est le deuxième constituant du tissu conjonctif (Listrat *et al.*, 2015 ; Dubost *et al.*, 2013). Elle représente environ 10% de la masse du tissu conjonctif. C'est une protéine fibreuse, élastique constituée de deux types de fibres : les fibres épaisses (5 à 10 µm de diamètre), orientées parallèlement aux cellules musculaires, et les fibres fines (1 à 2 µm de diamètre) qui suivent l'alignement des fibres de collagène du périnysium et de l'endomysium. L'élastine résiste à la cuisson dans l'eau ; elle gonfle mais ne se dissout pas. Elle résiste aussi à la plupart des protéases : pepsine, trypsine et chymotrypsine.

I.4. Lipides intramusculaires

Les lipides du muscle sont majoritairement des lipides de structure (les phospholipides) et des lipides de réserve (les triglycérides et le cholestérol) (Lonergan *et al.*, 2010). Les triglycérides sont stockés pour une part mineure (5-20%) dans le cytoplasme des fibres musculaires sous forme de gouttelettes lipidiques (lipides intramyocellulaires), l'essentiel (80% environ) étant stocké dans les adipocytes (Essen-Gustavsson *et al.*, 1994).

La teneur en lipides intramusculaires (LIM) dépend fortement de la taille et du nombre des adipocytes intramusculaires. Chez le bovin, la teneur en LIM du muscle *Longissimus thoracis* varie de 0,6 à 23,3% respectivement chez des Blanc Bleu Belge et des Noir Japonais à l'âge d'abattage de 24 mois (Gotoh *et al.*, 2009). Par ailleurs, la comparaison de la teneur en LIM entre les races Aberdeen Angus, Limousine et Blanc Bleu Belge a montré des teneurs plus faibles chez les animaux Blanc Bleu Belge comparativement aux Angus, les Limousins étant intermédiaires (Cuvelier *et al.*, 2006). En outre, l'amélioration génétique a eu aussi une influence sur la teneur en lipides et aujourd'hui, les carcasses des races améliorées, possèdent moins de lipides que celles des races rustiques (Alfonso *et al.*, 2004).

I.5. Le métabolisme énergétique

Les différentes voies métaboliques existantes dans le muscle produisent de l'ATP avec des efficacités différentes en fonction des substrats dégradés. Les principales voies du métabolisme énergétique musculaire peuvent être définies par leur besoin en oxygène, par les sources d'énergie qu'elles utilisent (substrats énergétiques), par la quantité d'énergie qu'elles fournissent (ATP) et par les moyens utilisés pour la produire (activités enzymatiques). Les trois principales voies de production de l'ATP sont détaillées Figure 07 :

- Ξ La voie anaérobie alactique est la première source de régénération rapide de l'ATP, à partir des activités de la créatine kinase et de la myokinase (ou adénylate kinase) ([Schiaffino et Reggiani, 2011](#)).
- Ξ La voie anaérobie lactique (voie glycolytique) transforme le glucose ou le glycogène en lactate via la glycolyse dans le cytoplasme. Cette voie fournit 3 molécules d'ATP par unité de glucose dégradé ([Salway, 2013](#)). Ne nécessitant pas d'O₂, cette voie fonctionne encore après l'abattage de l'animal et participe à la transformation biochimique du muscle en viande.
- Ξ L'oxydation mitochondriale (voie oxydative) nécessite de l'O₂ et produit de l'énergie à partir de la dégradation du pyruvate (issu de la glycolyse ou de la glycogénolyse) ou des acides gras (issus de la β -oxydation). Cette voie produit 34 molécules d'ATP par unité de glucose dégradé et 129 molécules d'ATP par molécule de palmitate oxydée ([Salway, 2013](#)).

Il est à signaler que la principale source d'énergie du muscle est le glucose qui provient soit du stock naturel de glucose du muscle, le glycogène, un gros polyholoside de poids moléculaire variable, soit de la circulation sanguine, issu de l'alimentation ou du stock de glycogène du foie. Dans le premier cas, avant d'entrer dans les voies de régénération de l'ATP, le glycogène est d'abord hydrolysé en glucose-1-phosphate par la voie de la glycogénolyse. Le glucose provenant du sang ou de la dégradation du glycogène, entre dans la voie de la glycolyse commune à l'ensemble des cellules de l'organisme. Puis, en fonction de l'équipement enzymatique et de l'oxygénation de la cellule, le produit de dégradation du glucose, le pyruvate, emprunte soit la voie de la phosphorylation oxydative, nécessitant un apport d'oxygène, soit la voie de la fermentation lactique, réalisée en absence d'oxygène.

Par ailleurs, après l'abattage, la mort physiologique de l'animal peut alors être caractérisée par l'absence de l'homéostasie. Comme il n'y a plus d'apport d'O₂ au muscle, seules les voies

anaérobies vont en principe continuer à fonctionner pendant les heures qui suivent l'abattage. Il a été montré qu'une dégradation post-mortem rapide de l'ATP et une forte activité d'enzymes glycolytiques (notamment la glycogène phosphorylase GP) accélèrent la vitesse de chute du pH, ce qui confère au tissu musculaire une moindre qualité intrinsèque de la viande (Krischek *et al.*, 2011). Ces résultats soulignent l'importance du métabolisme musculaire, élaboré tout au long de la croissance de l'animal, pour contrôler les qualités technologiques et sensorielles des viandes.

En outre, bien que la voie calcique ne soit pas reliée directement au métabolisme énergétique de la cellule musculaire, les ions Ca^{2+} du cytosol sont impliqués dans de nombreux processus à l'intérieur de la fibre musculaire : ils déclenchent la contraction musculaire (second messenger entre l'influx nerveux et les protéines contractiles), régulent l'activité de nombreuses protéines calcium-dépendantes et peuvent aussi être captés par la mitochondrie. Le fonctionnement et le métabolisme de la fibre musculaire sont ainsi fortement influencés par les flux de calcium entre les différents compartiments cellulaires (Raffaello *et al.*, 2012 ; Calì *et al.*, 2012 ; Glancy et Balaban, 2012 ; Rizzuto et Brini, 2013 ; Orrenius *et al.*, 2015). Quelques récents travaux proposent que l'homéostasie du calcium mitochondriale joue un rôle prépondérant dans les phénomènes de production d'énergie après la mort de l'animal (Ouali *et al.*, 2013 ; England *et al.*, 2013). Cet aspect sera développé dans le chapitre II en relation à l'apoptose et les mitochondries.

Chapitre II

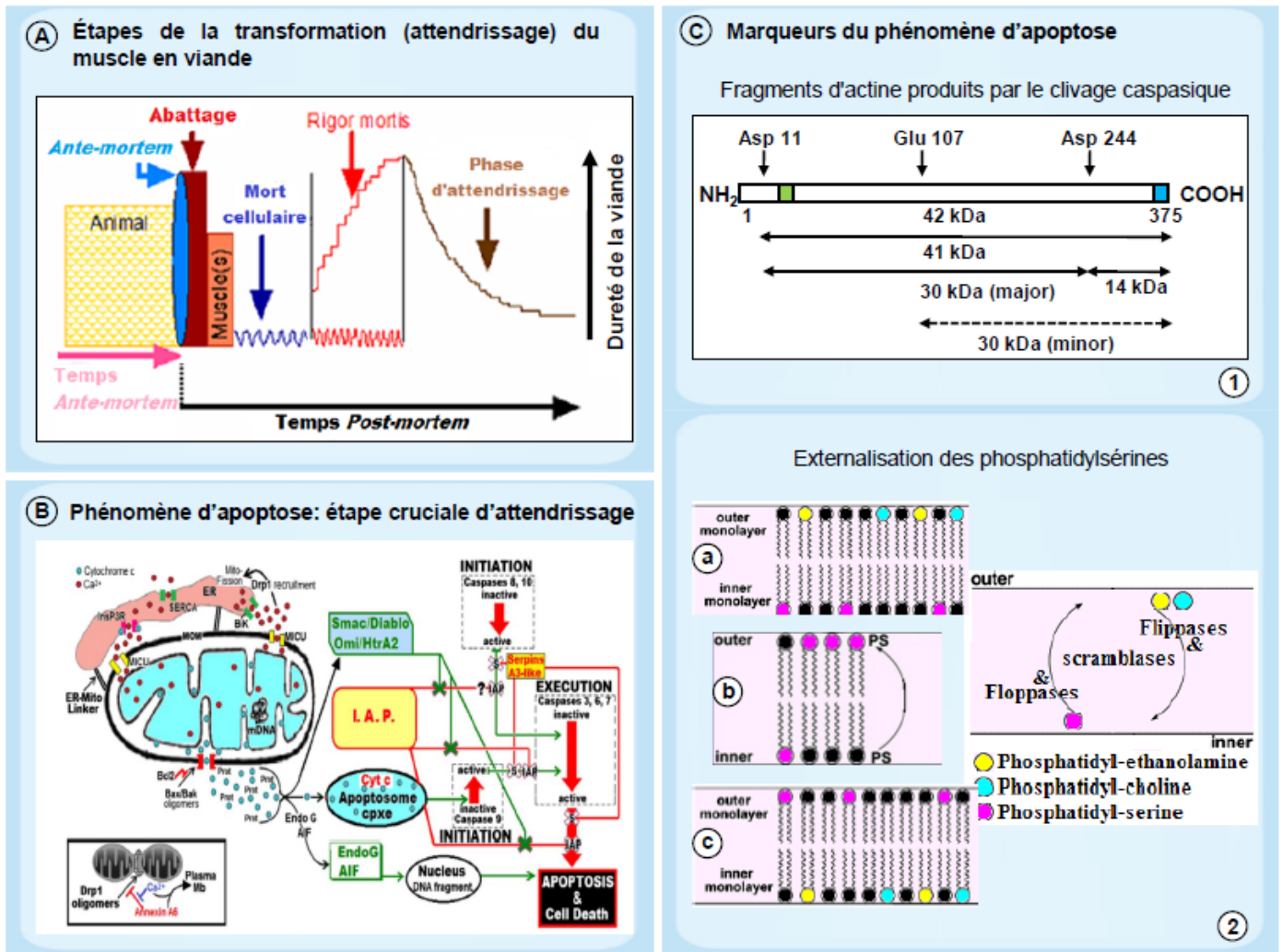


Figure 08. Etapes clés de la transformation du muscle en viande et phénomène d'apoptose.

A) Les différentes phases de transformation du muscle en viande revues par [Ouali et al. \(2006\)](#) en proposant une étape précoce correspondant à l'initiation du phénomène d'apoptose.

B) Le rôle central du phénomène d'apoptose dans la mise en place des qualités des viandes et ses conséquences biochimiques et structurales sur la cellule et le rôle clé du calcium (Ca^{2+}).

C) Exemples de marqueurs du phénomène d'apoptose :

(1) Fragments d'actine (un des indicateurs du phénomène) produits par le clivage caspasique ;

(2) Inversion de l'asymétrie des phospholipides de la membrane plasmique : phénomène d'externalisation des phosphatidylsérines et de l'internalisation des phosphatidylcholines et éthanolamines.

Chapitre II

« Transformation *post-mortem* du muscle en viande et rôle de l'apoptose »

II.1. Transformation du muscle en viande

Après la saignée, l'arrêt de la circulation sanguine stoppe l'apport en oxygène et en nutriments et face à ceci les cellules n'ont qu'une seule issue : la voie de la mort cellulaire. L'évolution physico-chimique et biochimique des muscles squelettiques initiée par cette mort conduit à la transformation *post-mortem* du muscle en viande.

Celle-ci se produit dès la saignée et se déroule en plusieurs phases (Figure 08a) : la phase de mort cellulaire programmée (MCP), ou apoptose, qui ne dure que quelques minutes à quelques heures ; la phase d'installation de la rigidité cadavérique ou *rigor mortis*, pendant laquelle le muscle conserve encore une activité métabolique ; et la phase de maturation, période la plus longue et pendant laquelle le muscle subit un ensemble de modifications physiques et biochimiques conduisant à la viande. Les modifications que subit le muscle pendant la période de maturation conditionnent au final les qualités organoleptiques de la viande et en particulier la tendreté.

L'hypothèse de l'implication de l'apoptose dans les modifications *post-mortem* du muscle en viande a été proposée pour la première fois par [Ouali et al. \(2006\)](#). Elle a été émise à partir d'un constat simple : le stress engendré par l'arrêt de la circulation sanguine déclenche la mort cellulaire, les cellules s'engagent alors dans une voie de mort programmée. L'apoptose serait donc un processus précoce intervenant dans la mise en place des qualités des viandes et en particulier la tendreté ([Ouali et al., 2006](#)). Selon cette théorie il existerait une étape supplémentaire dans l'évolution de la tendreté, avant la phase de *rigor mortis*, durant laquelle l'apoptose a un rôle prépondérant (Figure 08a).

Selon ces auteurs, les premières protéases actives lors de l'abattage seraient les caspases dont la fonction première est de cliver les protéines cellulaires *in vivo*. Leurs substrats dans la cellule seraient nombreux, ce qui est comparable à ce qui a été rapporté pour les calpaïnes. Les caspases pourraient donc dégrader des protéines clés dans l'organisation structurale des myofibrilles ([Nakanishi et al., 2001](#) ; [Chen et al., 2003](#)), conjointement avec d'autres

protéases, et donc ainsi jouer un rôle de premier plan dans la mise en place précoce de la tendreté, avant les calpaïnes.

La seconde phase de « *rigor mortis* » ou rigidité cadavérique, s'installe progressivement et conjointement avec la première phase. Elle se caractérise par des tissus musculaires plus durs, inextensibles. La *rigor mortis* est la résultante de l'acidification du tissu musculaire à l'origine d'une baisse de pH, et de la contraction des fibres musculaires (Harper, 1999; Maltin *et al.*, 2003). En effet, en raison de l'arrêt de l'apport d'oxygène après l'abattage des animaux, le muscle s'oriente d'un métabolisme aérobie vers un métabolisme anaérobie conduisant à la production d'acide lactique jusqu'à l'épuisement des réserves énergétiques (glycogène) et l'inhibition des enzymes de la glycolyse, responsables de la dégradation du glycogène (Pearson, 2012 ; Shen, 2015). L'accumulation d'acide lactique qui en résulte, entraîne une acidification du milieu, contribuant à l'abaissement du pH dont la vitesse et l'amplitude auront, une très forte incidence sur la qualité finale de la viande. Cette baisse de pH est également à l'origine de l'inhibition des enzymes responsables de la lyse de l'ATP (ATPases sarcoplasmiques) provoquant une fuite de Ca^{2+} dans le réticulum qui, à forte concentration, induit la formation de complexes actine-myosine avec pour conséquence une contraction musculaire. Les réserves énergétiques du muscle étant épuisées, la dissociation de ces complexes, qui requiert de l'énergie, ne peut plus avoir lieu.

Le muscle se durcit, la rigidité cadavérique s'installe. Au bout de 24h, le pH ultime est stable, avec une valeur avoisinant 5,6, les complexes actine-myosine sont majoritaires et tout l'ATP a été consommé : le muscle atteint alors son maximum de dureté.

C'est au cours de la dernière phase de transformation du muscle, la maturation, que la viande commence à s'attendrir. Il s'agit de l'étape la plus importante car elle conduit à une augmentation de la tendreté de la viande. La maturation met en jeu différents systèmes protéolytiques endogènes conduisant à des altérations de la structure et de la composition biochimique des muscles (protéolyse *post-mortem* ; Harper, 1999). Plusieurs systèmes protéolytiques semblent être impliqués : le système lysosomal (cathepsines D, B, H et L), le système ubiquitine-protéasome ATP dépendant, le système calpaïne/calpastatine, les métalloprotéinases de la matrice extracellulaire et les caspases/serpines (Sentandreu *et al.*, 2002 ; Maltin *et al.*, 2003; Ouali *et al.*, 2006 ; Kemp *et al.*, 2010 ; Pearson, 2012 ; Shen, 2015). L'ensemble de ces systèmes assure conjointement l'hydrolyse des protéines myofibrillaires favorisant l'attendrissage de la viande.

Toutefois, leurs activités et la sensibilité de leurs substrats dépendent de nombreux facteurs tels que la température et la durée de la maturation de la viande, la chute du pH ou encore l'augmentation de la pression osmotique consécutive à l'accumulation d'acide lactique dans le milieu (Geay *et al.*, 2001 ; Pearson, 2012 ; Lonergan *et al.*, 2010 ; Smulders *et al.*, 2014).

II.2. Evolution du pH *post-mortem*

L'acidification du muscle lors de sa transformation en viande résultant de la glycolyse *post-mortem* induit une modification du pH. La vitesse et l'ampleur de la chute de pH dans le muscle *post-mortem* sont des facteurs importants de qualité de la viande. L'acidification du muscle *post-mortem* va en effet avoir une influence sur de nombreux processus cellulaires comme la migration des ions, l'osmolarité, la perméabilité des membranes, les mécanismes enzymatiques, la contraction musculaire (Zamora *et al.*, 2005) et la capacité de rétention d'eau (Offer, 1991).

La vitesse de diminution du pH *post-mortem* est déterminée principalement par l'activité ATPasique. Tous les facteurs modifiant cette activité entraînent un changement de la vitesse de diminution du pH (Bendall, 1973). Dans de bonnes conditions d'abattage, le pH diminue progressivement pour se stabiliser à une valeur appelée pH ultime après 2 heures chez la volaille, 6 à 8 heures chez le porc et 24 h chez le bovin. L'accélération de la diminution du pH est due à l'activation du métabolisme de dégradation du glycogène avant la mort et à son maintien *post-mortem*. L'amplitude de la diminution du pH *post-mortem* détermine la valeur du pH ultime (pHu). Le pHu est l'un des prédicteurs de la qualité technologique de la viande utilisé dans les abattoirs. Il explique une part non négligeable de la variabilité de la tendreté, la jutosité et la flaveur (Bendall, 1973 ; Boudjellal *et al.*, 2008). De nombreuses études ont montré que plus les réserves en glycogène sont importantes plus la valeur du pHu est faible.

En outre une relation existe entre le type de fibre et l'évolution du pH *post-mortem*. Lefaucheur, (2001) rapporte une corrélation positive entre la valeur du pHu et la proportion des fibres de type I. Selon Larzul *et al.* (1997), la taille de ces fibres est corrélée négativement avec la vitesse de chute du pH dans le muscle *Longissimus* du porc.

Les fibres de type IIB sont souvent citées comme étant reliées négativement à la qualité de la viande (Essen-Gustavsson *et al.*, 1992 ; Karlsson *et al.*, 1999 ; Chang *et al.*, 2003). Larzul *et al.* (1997) ont montré qu'une augmentation de la proportion de ce type de fibres ainsi que de leur taille entraînait une augmentation de la vitesse de chute du pH et une diminution du pHu.

De nombreux résultats ont mis en évidence un effet du pHu sur la tendreté de la viande. Des relations linéaires positives entre pHu et tendreté, estimée par mesure mécanique ou par analyse sensorielle, ont été rapportées pour la viande bovine (Bouton *et al.*, 1973; 1982) et de veau (Guignot, 1992). D'autres travaux ont révélé l'existence d'une relation curvilinéaire (Purchas, 1990 ; Holdstock *et al.*, 2014 ; Wu *et al.*, 2014). De telles relations ont été obtenues lorsque le pHu présentait une large amplitude de variation (5,4 à 7,0). Une valeur minimale de la tendreté a été enregistrée pour des valeurs de pH variant de 5,7 à 6,0.

Plusieurs travaux suggèrent que la relation négative entre la tendreté et le pHu, lorsque ce dernier varie de 5,7 à 6,0, pourrait être due à une augmentation corrélative du degré de contraction des myofibrilles. Cette hypothèse est appuyée par la corrélation négative entre le pHu et la longueur des sarcomères (Bouton *et al.*, 1973 ; Purchas, 1990). L'augmentation de la tendreté enregistrée lorsque le pH ultime augmente au-delà de pH 6,0, a été attribuée à une amélioration conjointe de la capacité de rétention d'eau de la viande (Purchas, 1990). La relation curvilinéaire entre le pH ultime et la tendreté pourrait également refléter des différences dans l'intensité de la protéolyse au cours de la maturation.

II.3. Apoptose ou Mort Cellulaire Programmée (MCP)

II.3.1. Définition

Le terme « apoptose » ou mort cellulaire programmée a été introduit en 1972 pour définir une forme de mort cellulaire morphologiquement, biochimiquement et moléculairement différente de la nécrose, seule forme de mort cellulaire connue jusqu'alors (Kerr *et al.*, 1972). Le mot « apoptose » fait référence à la chute programmée des feuilles caduques en automne : « *apo* » pour éloignement et « *ptose* » pour chute en grec ancien. L'apoptose est un processus actif et physiologique de mort cellulaire, utilisé pour éliminer les cellules en excès, endommagées ou infectées, potentiellement dangereuses pour l'organisme.

II.3.2. Rôle physiologique de l'apoptose

Au cours de l'embryogenèse, de nombreuses structures initialement mises en place au cours du développement sont ensuite détruites par apoptose. C'est le cas du canal de Müller qui est détruit chez les hommes, du canal de Wolff qui est détruit chez la femme. L'apoptose participe également à la morphogenèse des doigts où les cellules de l'espace interdigital des doigts d'un embryon disparaissent par apoptose (Wood *et al.*, 2000). La mise en place des systèmes nerveux et immunitaire fait également appel à l'apoptose qui assure qu'un nombre

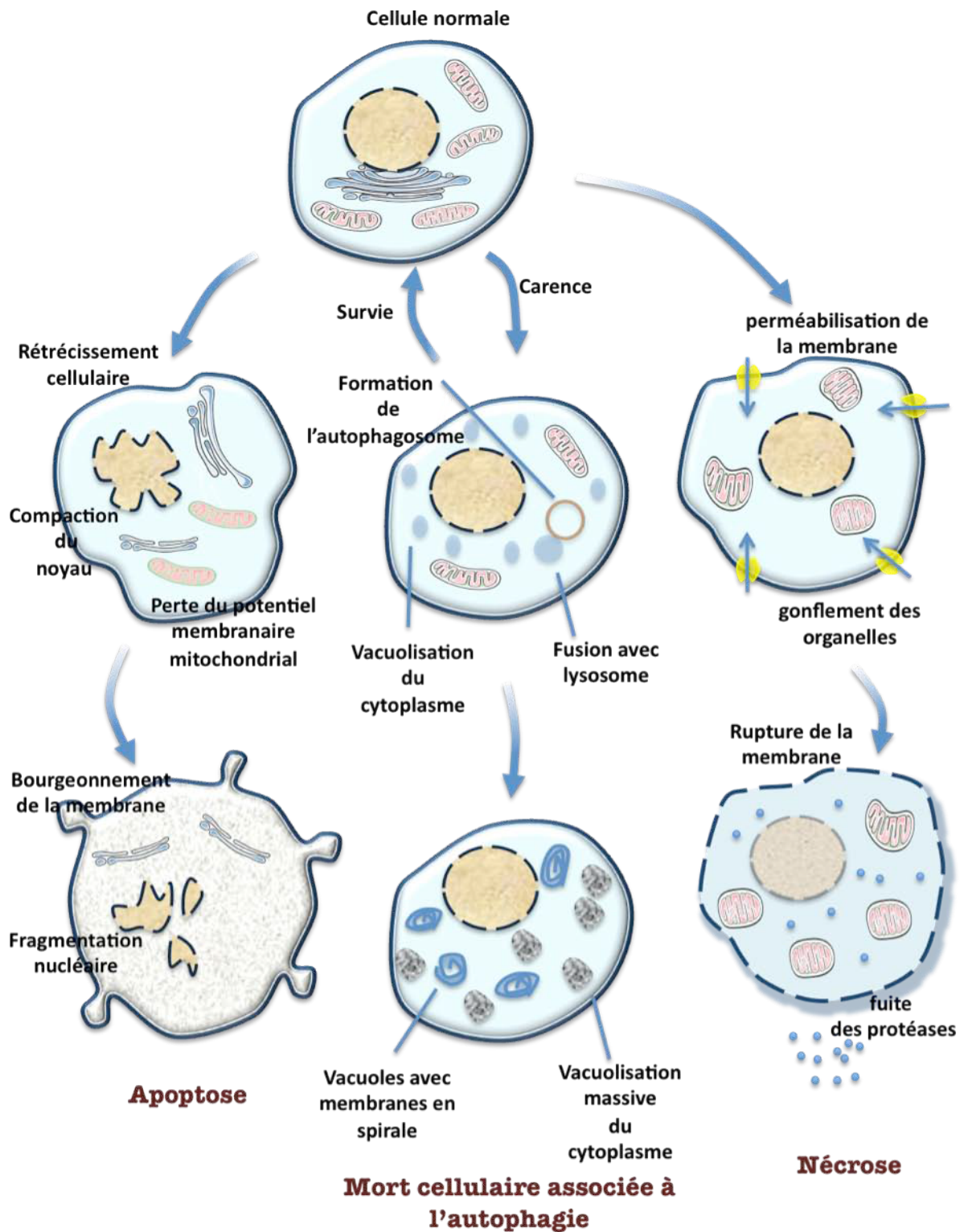


Figure 09. Les trois voies de la mort cellulaire (Hotchkiss *et al.*, 2009).

Selon les types cellulaires et les stimuli, une des trois voies de mort cellulaire-apoptose, autophagie et nécrose- peut être préférentiellement impliquées. Les caractéristiques morphologiques des trois types de mort cellulaire sont illustrées.

correct de cellules souches se différencient. Pendant le développement embryonnaire, les neurones sont générés en excès et les cellules surnuméraires vont ensuite mourir par apoptose afin de créer un équilibre entre les neurones et les cibles qu'ils innervent (Clarke *et al.*, 1998).

II.3.3. Autophagie et apoptose

Le terme autophagie désigne un processus d'autodigestion de matériel cellulaire par la voie de dégradation lysosomale. C'est un mécanisme déclenché par la cellule pour permettre la survie cellulaire en condition de carence nutritionnelle. Il existe plusieurs types d'autophagie. La *micro-autophagie* permet la séquestration de petites portions de cytoplasme dans les lysosomes par invagination de la membrane lysosomale. L'*autophagie dépendante des chaperonnes* permet l'adressage de protéines solubles mal repliées aux lysosomes. La *macro-autophagie* communément appelée autophagie permet la dégradation des protéines à durée de vie longue et des organites endommagés (Mizushima *et al.*, 2008). En effet, l'autophagie est un processus de dégradation qui fournit à la cellule un apport d'acides aminés ou d'acides gras essentiels à la synthèse protéique ou lipidique. Cependant, une autophagie dérégulée peut également conduire à la mort cellulaire probablement par autoconsommation excessive des constituants vitaux de la cellule. On parle de mort cellulaire associée à l'autophagie plutôt que de mort par autophagie car malgré la présence de nombreuses vacuoles d'autophagie dans des cellules en cours de mort, l'implication directe de l'autophagie dans la mort cellulaire n'est pas clairement établie. En fait, l'autophagie servirait de mécanisme de secours pour induire la mort si l'apoptose est déficiente (Levine *et Yuan*, 2005).

II.3.4. Nécrose et apoptose

La nécrose est considérée comme une mort cellulaire « désordonnée » (Figure 09). En effet au cours de la nécrose, les cellules se gorgent d'eau au point que cela entraîne la lyse de leur membrane plasmique. C'est une véritable explosion cellulaire qui conduit à la libération, dans le milieu environnant, du contenu cytoplasmique. Les organites cellulaires eux aussi gonflent et se vident de leur contenu. L'ADN nucléaire est dégradé de manière aléatoire par des endonucléases activées notamment par des serine peptidases. La taille des fragments d'ADN ainsi générés est très hétérogène. La nécrose d'une cellule affecte les autres cellules par l'action des enzymes intracellulaires libérées et des macrophages qui viennent en renfort pour nettoyer le site. Le résultat est que toute une région de l'organe devra être régénérée après destruction totale des cellules endommagées (Fidzianska *et al.*, 1991 ; Buja *et al.*, 1993 ; Majino *et Jons*, 1995 ; Ouali *et al.*, 2006).

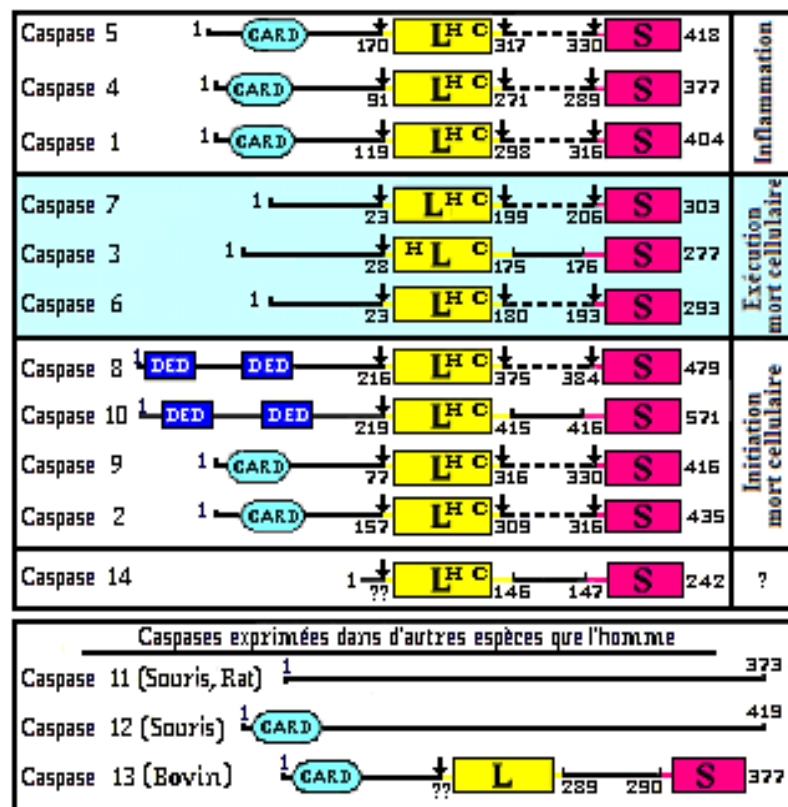


Figure 10. Structure schématique des précurseurs des caspases (Herrera-Mendez *et al.*, 2006a).

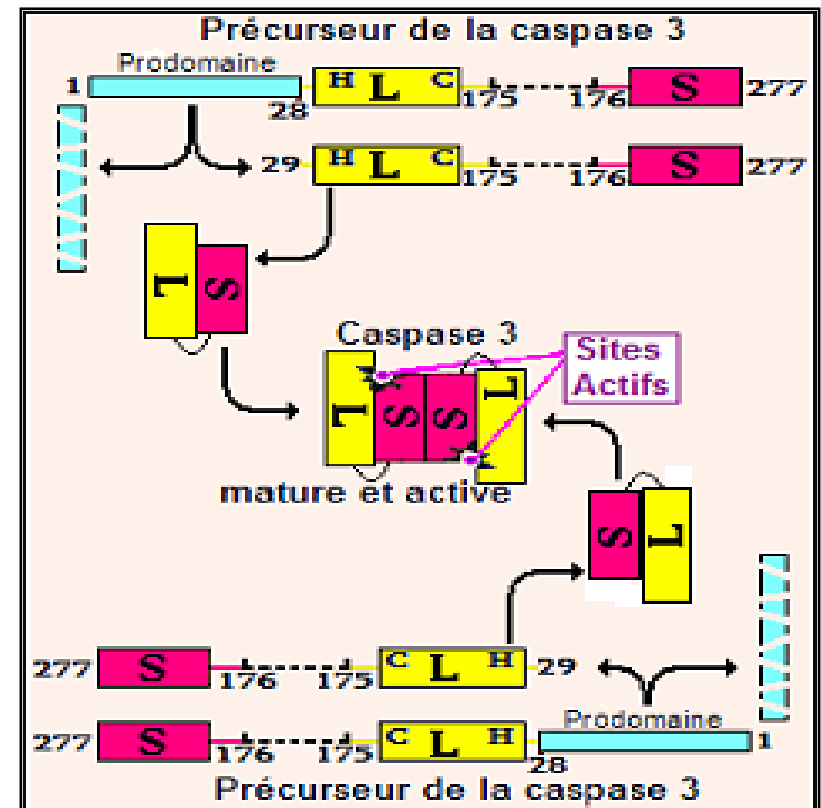


Figure 11. Schéma de maturation du précurseur de la caspase 3 en caspase 3 active (Herrera-Mendez *et al.*, 2006a).

Par opposition à la nécrose, l'apoptose est considérée comme une mort cellulaire « ordonnée », procédant en différentes étapes (Figure 08a,b) (Wyllie *et al.*, 1980 ; Buja *et al.*, 1993 ; Majino et Jons, 1995 ; Martin *et al.*, 1995 ; Bratton *et al.*, 1997 ; Matsura *et al.*, 2005 ; Youle et Karbowski, 2005) et ce, quelle que soit la voie d'induction (radiation, présence de molécules chimiques ou hormonales, mitose incomplète, ...etc.) :

- ☒ Tout d'abord, les cellules en apoptose s'isolent des autres par perte de contact entre les cellules ;
- ☒ On assiste ensuite à une importante condensation à la fois du noyau et du cytoplasme ce qui induit une diminution significative du volume cellulaire ;
- ☒ Les mitochondries de la cellule apoptotique subissent plusieurs modifications majeures : libération du cytochrome c dans le cytoplasme, diminution du potentiel membranaire (Ψ_m) et altération de la perméabilité membranaire avec ouverture de pores spécialisés ;
- ☒ Après condensation du noyau, la chromatine est clivée en fragments réguliers d'environ 180 paires de bases ;
- ☒ Parfois, la membrane plasmique bourgeonne et forme des corps apoptotiques renfermant une partie du cytoplasme de la cellule ;

Afin de faciliter la reconnaissance des corps apoptotiques par les phagocytes, la cellule signale son état apoptotique à son environnement grâce au changement de localisation des molécules de phosphatidylsérines qui passent d'une orientation cytoplasmique à une orientation extracellulaire.

II.3.5. Les peptidases apoptogènes (les Caspases)

L'évidence scientifique actuelle suggère que l'apoptose est une caractéristique de la cellule musculaire (Sandri et Carraro, 1999 ; Primeau *et al.*, 2002 ; Sandri, 2002 ; Leeuwenburgh, 2003 ; Tews, 2002, 2005). En accord avec ce rapport, l'expression de différentes caspases (caspases-1, -3, -6, -8 et -9...) et de divers régulateurs de l'apoptose (activateurs ou inhibiteurs) a été vérifiée dans les cellules du muscle squelettique (Biral *et al.*, 2000 ; Belizario *et al.*, 2001 ; Sandri *et al.*, 2001).

Les peptidases apoptogènes sont des peptidases à cystéine qui possèdent une spécificité stricte de clivage de leurs substrats après un résidu d'acide aspartique (Asp ou D). Une nouvelle nomenclature proposée par Alnemri *et al.* en 1996, regroupe désormais les peptidases apoptogènes sous le nom de CASPASE (Cysteiny ASPartate-specific peptidASE). Le C du mot caspase représente la cystéine du centre actif ; « ASP » définit la spécificité

stricte de clivage des substrats de cette famille de peptidases après un acide aspartique, l'ensemble étant suivi du suffixe « ASE » qui est le suffixe commun à toutes les enzymes (Alnemri *et al.*, 1996). L'ICE, (*Interleukin-1 β Converting Enzyme*) qui fut, chronologiquement la première caspase caractérisée, a donc été tout naturellement rebaptisée caspase 1. À ce jour 14 caspases ont été identifiées mais il ne fait aucun doute que cette liste n'est pas exhaustive (Figure 10).

Dans le monde vivant, toutes les caspases ont une structure très conservée (Figure 10) comprenant : **i**) un prodomaine N-terminal de taille variable, ayant un rôle primordial dans les interactions protéine-protéine, en particulier avec les protéines régulatrices de l'apoptose ; **ii**) un second domaine qui deviendra, après clivage, la grande sous-unité (L pour *Large*) et qui porte le site actif de l'enzyme avec un résidu cystéine (C) et un résidu histidine (H) ; et **iii**) un troisième domaine qui deviendra, après clivage, la petite sous-unité (S pour *Small*) et qui a un rôle conformationnel (Fuentes-Prior et Salvesen, 2004).

Sous cette forme, l'enzyme est inactive. Pour qu'elle soit activée, l'enzyme doit subir une maturation au cours de laquelle le prodomaine N-terminal est éliminé. Puis, deux molécules d'enzyme s'associent pour former un dimère, possédant deux sites actifs en position tête-bêche (Figure 11). L'activation des sites actifs ne peut se faire qu'au niveau du dimère après association à des complexes activateurs par l'intermédiaire d'interaction DED-DED (*Death Effector Domains*) ou CARD-CARD (*Caspase Recruitment Domain*) (Herrera-Mendez *et al.*, 2006a ; Ouali *et al.*, 2006 ; Fuentes-Prior et Salvesen, 2004).

II.3.6. Schéma général de l'apoptose

Plusieurs voies conduisant à l'apoptose ont été mises en évidence. Les principales sont les voies intrinsèque et extrinsèque (Figure 08b). Il existe également deux voies mineures qui font intervenir le réticulum endoplasmique et le granzyme B. Des revues récentes décrivent en détail ces différentes voies (Dlamini *et al.*, 2004 ; Ouali *et al.*, 2006 ; Rupinder *et al.*, 2007 ; Bao et Shi, 2007 ; O'Brien et Kirby, 2008 ; Sakamaki et Satou, 2009).

Le processus apoptotique se déroule, en général, selon un programme relativement précis, caractérisé successivement par une phase d'initiation, dépendante de la nature du stimulus et du type de cellule, suivie d'une phase d'exécution via les caspases effectrices (Figure 08b). Le stimulus déclenchant le processus d'apoptose peut provenir de l'extérieur de la cellule (voie extrinsèque) par l'intermédiaire de l'activation des récepteurs de mort ou de l'intérieur (voie

intrinsèque) en réponse à des conditions très défavorables à la survie de la cellule. Dès lors, les caspases initiatrices vont être activées au niveau de complexes oligomériques et vont à leur tour activer les caspases exécutrices qui vont prendre en charge la déstructuration des cellules (Fuentes-Prior et Salvesen, 2004 ; Ouali *et al.*, 2006).

II.3.6.1. La voie extrinsèque

Cette voie correspond à un stimulus impliquant les récepteurs de mort cellulaire qui sont capables de fixer des protéines inductrices ou inhibitrices du processus apoptotique de type cytokines (Figure 08b). Ces récepteurs de mort appartiennent à la superfamille des récepteurs au *tumor necrosis factor* (TNFR) et incluent des récepteurs tels que le récepteur Fas, les récepteurs au TNF (TNFR-1, TNFR-2) et les récepteurs au *TNF-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) DR-4 et DR-5 (Ashkenazi, 2002).

Dans le cas d'une protéine inductrice d'apoptose, sa fixation au récepteur va activer un complexe intracellulaire qui va pouvoir lier les peptidases initiatrices qui sont les caspases 8 et 10, par l'intermédiaire des domaines DED ou CARD. Cette étape est régulée par des protéines inhibant cette interaction et porteuses du même type de domaines. Un excès de ces protéines va détourner les caspases de leur complexe activateur cible. La caspase 8 active, prise en exemple ici, ainsi que la caspase 10 peuvent, à ce stade, être rendues inactives par fixation, au voisinage de leur site actif, de protéines inhibitrices d'apoptose ou IAP (*Inhibitors of Apoptose*). Dans le cas contraire, ces caspases vont être en mesure d'activer à leur tour les caspases exécutrices (caspases 3 et 7) responsables de la déstructuration de la cellule.

II.3.6.2. La voie intrinsèque

Cette voie correspond à des situations particulières où la cellule n'a pas d'autres solutions que le suicide. C'est donc elle-même qui va déclencher l'apoptose. En dehors de son rôle métabolique, il est apparu depuis une dizaine d'années que la mitochondrie joue un rôle clé dans l'apoptose (Green et Reed, 1998 ; Kroemer et Reed, 2000). De manière générale, la voie mitochondriale de l'apoptose est induite par des signaux de stress cellulaire tels que l'exposition à des radiations UV, une irradiation γ , des dommages à l'ADN, une déprivation en facteurs de survie ou encore suite à l'action d'oncoprotéines, de protéines suppresseur de tumeurs comme la protéine p53 ou de protéines de virulence virale. Enfin, la voie mitochondriale est activée par la plupart des agents chimiothérapeutiques (Kaufmann *et al.*, 2000 ; Kroemer, 2003).

Ce processus implique une détérioration des mitochondries par des protéines proapoptotiques de type *Bax*. Les mitochondries subissent une perte du potentiel membranaire (Ψ_m) et une perméabilisation de la membrane externe conduisant à la libération du cytochrome c (facteur proapoptotique) dans le cytosol. Cette altération est liée à la fixation d'un complexe protéique incluant *Bax* au niveau de la membrane mitochondriale. À noter que *Bcl2*, une protéine de la même famille que *Bax*, a quant à elle, une activité antiapoptotique et tendra à préserver la membrane mitochondriale. Le rapport de concentration de ces deux protéines antagonistes définira la vitesse avec laquelle le cytochrome c sera libéré dans le cytosol. Le cytochrome c libre va alors former un complexe appelé apoptosome, impliquant, entre autre, une protéine désignée sous le nom de Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) et la caspase 9. L'apoptosome constitue le site d'activation de la caspase 9. Une fois activée, la caspase 9 pourra à son tour activer les caspases effectrices (caspases 3 et 7). L'activation de la cascade des caspases est quant à elle régulée par les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) qui se lient directement aux caspases et empêchent le clivage des caspases nécessaire à leur activation (Deveraux et Reed, 1999 ; Fesik et Shi, 2001).

II.4. Mise en place de l'apoptose *post-mortem* et conséquences

Comme on l'a vu, la mort dans un tissu vivant peut se produire par nécrose ou apoptose. Puisque la nécrose n'a jamais été rapportée dans le muscle *post-mortem* (Becila *et al.*, 2010 ; Kemp et Parr, 2012 ; Cao *et al.*, 2013 ; Zhang *et al.*, 2013 ; Ouali *et al.*, 2013 ; Zhang *et al.*, 2013 ; Sierra et Olivan, 2013 ; Longo *et al.*, 2015 ; Huang *et al.*, 2016), le déclenchement de la mort cellulaire par le processus apoptotique est l'issue la plus probable.

En ce qui concerne la science de la viande, très peu de choses sont connues au sujet des mécanismes moléculaires de l'apoptose, mais cette étape préliminaire pourrait être d'importance cruciale dans le muscle *post-mortem* puisque tous les changements suivants qui contribuent à la conversion *post-mortem* du muscle en viande dépendront fortement de cet événement.

L'apoptose peut être mise en évidence par différentes caractéristiques morphologiques ou biochimiques, telles que le rétrécissement des cellules, les modifications mitochondriales par libération du cytochrome c et le changement du potentiel membranaire (Ψ_m), la dégradation de l'ADN nucléaire en fragments réguliers, changement de localisation des molécules de phosphatidylsérines (d'une orientation cytoplasmique à une orientation extracellulaire),

et enfin, la dégradation étendue des protéines cytosquelettiques spécifiques, telle que l'actine, présumé être un marqueur potentiel du processus d'apoptose. L'apoptose peut être aussi distinguée des autres types de morts cellulaires par les caractéristiques biochimiques, y compris l'activation de la cascade des caspases.

II.4.1. Signalisation de l'apoptose au niveau du muscle

De nombreuses questions et investigations ont été émises pour connaître la voie de mort que les cellules musculaires décident de prendre après la saignée de l'animal. Les suggestions plausibles ont été rapportées par [Ouali et al. \(2006 ; 2007\)](#). Une possibilité serait un changement irréversible dans les myofibrilles à la jonction neuromusculaire où des activateurs de la cascade apoptotique pourraient être produits. Une telle hypothèse est soutenue par la diminution rapide de l'efficacité de la stimulation électrique de basse tension ([Valin, 1982](#)) qui résulte d'un changement *post-mortem* rapide du système nerveux. De même, la dénervation a été montrée capable d'induire l'apoptose dans le muscle squelettique, un processus souvent lié à une fragmentation des myofibrilles ([Adams et al., 2001 ; Liu et Ahearn, 2001](#)).

Une autre hypothèse de l'induction de l'apoptose dans le muscle *post-mortem* pourrait être le dysfonctionnement des mitochondries (détérioration de la chaîne oxydante, augmentation intracellulaire de la concentration de radicaux libres (ROS), se produisant peu après la mort ([Renner, 1999](#)). En effet, le changement des mitochondries pourrait être un autre initiateur de l'apoptose par la libération des facteurs proapoptotiques comme le cytochrome c ([Adrian et Martin, 2001](#)). Ce sont deux voies possibles menant à l'apoptose dans le muscle *post-mortem* mais d'autres voies peuvent exister.

II.4.2. Caspases et attendrissage des viandes

Il est bien connu que l'attendrissage des viandes résulte de l'altération de la structure contractile par les enzymes protéolytiques endogènes. Les mécanismes sont donc en majorité de nature enzymatique et impliquent des peptidases endogènes ([Sentandreu et al., 2002](#)). Si on considère que la première phase intervenant lors de l'attendrissage des viandes est l'apoptose, on réalise que les peptidases les mieux placées pour altérer la structure contractile, seraient les caspases puisqu'il s'agit de leur fonction primaire ([Ouali et al., 2006](#)).

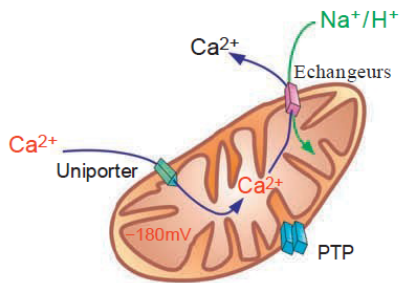
En outre, *in vitro* les caspases conservent 20 à 50% de leur activité à un pH compris entre 5 et 6 (Stennicke et Salvensen, 2000). Ainsi, les caspases peuvent encore agir dans le muscle *post-mortem* durant les phases de *rigor mortis* et de maturation. L'étude de Pulford *et al.* (2009) a confirmé le déclenchement de l'apoptose à la mort de l'animal. Ces auteurs ont montré, chez des animaux présentant un faible pHu, que l'activité des caspases 3 et 7 était plus élevée suggérant un taux d'apoptose plus important. Par ailleurs, l'activité de la caspase 9 est deux fois plus élevée que celle de la caspase 8, indiquant que la voie intrinsèque est privilégiée quel que soit le pHu. D'autres études ont montré que l'activité des caspases n'est pas entièrement perdue pendant le stockage *post-mortem*. Elles sont capables de cliver plusieurs protéines du muscle *post-mortem*, et elles ont aussi le pouvoir de dégrader et d'inactiver les calpastatines (inhibiteurs des calpaïnes) (Wang *et al.*, 1998 ; Kemp *et al.*, 2006 ; 2009 ; 2010 ; Kemp et Parr, 2012 ; Kemp et Wheeler, 2011).

II.4.3. Calpaïnes et apoptose

Les calpaïnes sont un groupe de peptidases à cystéine cytoplasmiques activées par le calcium (Ca^{2+} -dépendantes). Elles sont reliées en partie à la nécrose (Takano *et al.*, 2005). Les calpaïnes sont aussi activées dans les systèmes apoptotiques, où elles peuvent contrôler l'activité des protéines de régulation apoptotiques (Takano *et al.*, 2005) qui peuvent à leur tour être reliées à la mort cellulaire (Nath *et al.*, 1996 ; Takano *et al.*, 2005). Les premières observations ont été faites par Squier *et al.* (1994) qui ont détecté une activité protéolytique dans les thymocytes. En outre, plusieurs inhibiteurs de calpaïnes, en particulier la calpastatine permettent de prévenir l'apoptose (Squier *et al.*, 1994 ; Sarin *et al.*, 1994).

Il semble même qu'il y ait une collaboration entre caspases et calpaïnes depuis qu'il a été montré que la calpastatine pouvait être clivée par les caspases au cours de l'apoptose (Porn-Ares *et al.*, 1998 ; Wang *et al.*, 1998 ; Wang, 2000). Les calpaïnes sont connues pour avoir aussi le pouvoir d'identifier et de cliver des protéines du cytosquelette impliquées dans l'apoptose et l'attendrissage des viandes (Vanags *et al.*, 1996). Il a été montré que les caspases et les calpaïnes partagent des substrats communs suggérant qu'un mécanisme de communication de type *cross-talk* pourrait exister (Bizat *et al.*, 2003). Autre illustration de cette coopération, les calpaïnes contrôlent les caspases 9 et 3 en activant les proenzymes. Le rôle de la calpaïne au cours de l'apoptose est par ailleurs confortée par le fait qu'elle clive des molécules faisant partie du programme apoptotique comme Bax, promoteur apoptotique (Wood *et al.*, 1998 ; Choi *et al.*, 2001).

A) Conditions physiologiques



Activation des enzymes métaboliques
(Pyruvate, α -ketoglutarate, isocitrate déshydrogénase)
Modulation des canaux à Ca^{2+}
Détection des signaux à Ca^{2+}
Contrôle de la diffusion du calcium dans le cytosol

B) Agents apoptotiques et/ou altération des signaux du Ca^{2+}

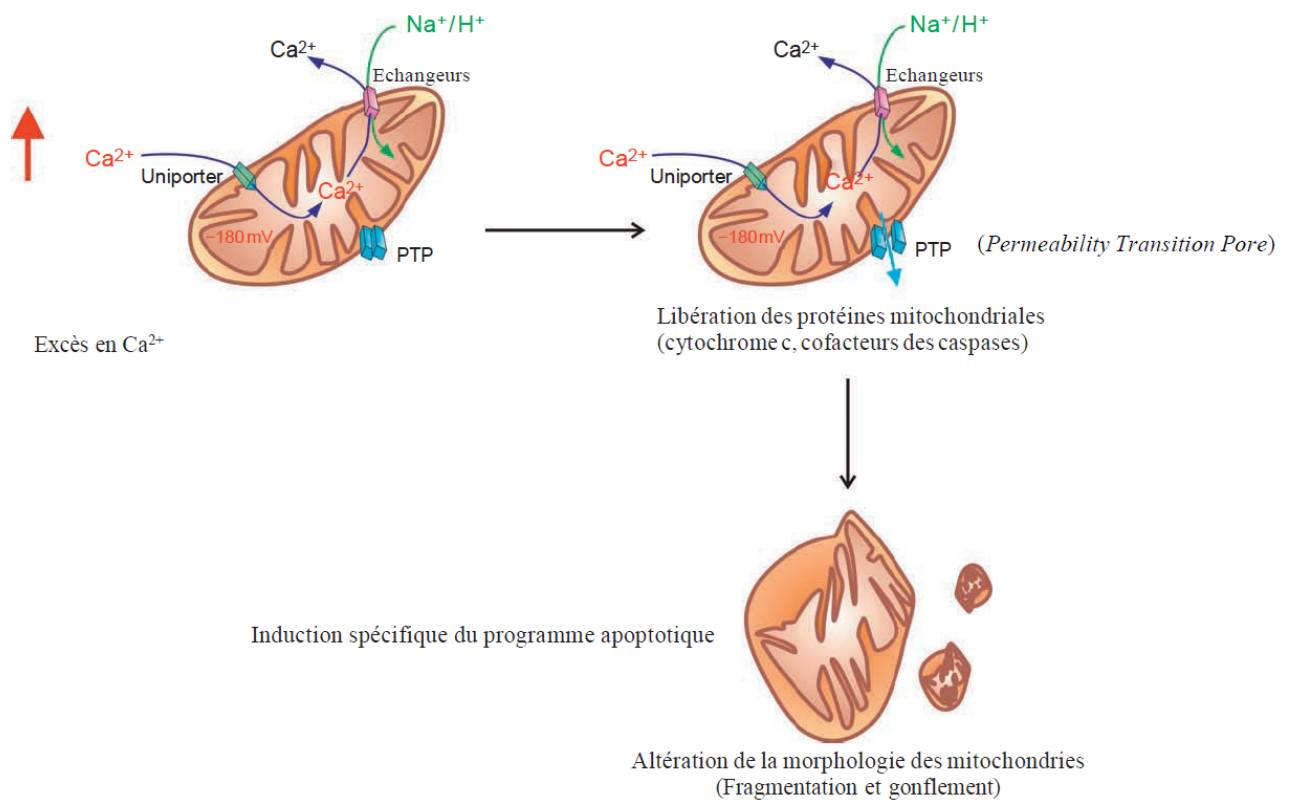


Figure 12. Voie de signalisation à Ca^{2+} mitochondriale (adapté de [Rizzuto et Brini, 2013](#)).

II.4.4. Calcium (Ca^{2+}) musculaire et apoptose

Le Ca^{2+} connu pour accélérer le processus d'attendrissage, a été montré comme un effecteur indispensable au déclenchement et au déroulement de l'apoptose (Szabadkai et Rizzuto, 2004 ; Orrenius *et al.*, 2003 ;2015). Le taux de Ca^{2+} s'élève durant l'installation de la *rigor mortis*, de manière consécutive à son relargage par le réticulum sarcoplasmique des cellules musculaires (Vignon *et al.*, 1989). L'augmentation du taux de Ca^{2+} intracellulaire permet de déclencher l'apoptose via la voie mitochondriale (libération du Cyt c) par l'activation de la caspase 9 qui, à son tour, activera les caspases effectrices, ce qui déclenchera la voie intrinsèque. Ceci est d'autant plus possible par la modification de la perméabilité de la membrane externe des mitochondries, libérant ainsi des signaux proapoptotiques à l'intérieur de la mitochondrie (Figure 12). Une augmentation de la perméabilité consiste en l'ouverture des pores de transition de Ca^{2+} de type PTP (*Permeability Transition Pore*), un complexe protéique localisé au niveau des points de contact entre les membranes mitochondriales interne et externe (Rizzuto et Brini, 2013). Ce complexe fonctionnant comme un canal de transfert, il est dépendant de la tension qui s'active par les fortes concentrations de Ca^{2+} , entraînant par conséquent l'ouverture des pores. Il permet ainsi aux molécules de faible poids moléculaire (telles que le Cyt c et les inhibiteurs AIF et autres cofacteurs) de quitter la mitochondrie (Glancy et Balaban, 2012 ; Orrenius *et al.*, 2015).

De plus, l'élévation du taux du Ca^{2+} pourrait être responsable de l'exposition de la phosphatidylsérine sur la face externe de la membrane (Zwaal *et al.*, 2005 ; Bevers et Williamson, 2010) ou aussi de la production d'énergie (Glancy et Balaban, 2012).

II.4.5. Oxydation cellulaire et apoptose

Le déclenchement de l'apoptose via la voie mitochondriale provoque un arrêt de la chaîne respiratoire et donc une perturbation du potentiel redox. Les molécules d'oxygène présentes se transforment en radicaux d'espèces oxygénés (ROS). Cette production augmentée de ROS et la perturbation de l'homéostasie du potentiel redox peuvent provoquer la réduction du groupement thiol des protéines constitutives du pore mitochondrial et leur activation conduisant à la perméabilisation du pore mitochondrial (Crompton, 1999). De plus, dans des carcinomes du colon, les ROS peuvent provoquer des changements de conformation de protéines proapoptotiques de la famille Bcl-2, comme Bax, facilitant la formation de pores dans la mitochondrie (Kim *et al.*, 2004). Stennicke et Salvesen (1999) ont montré que les ROS pouvaient inhiber les caspases par l'oxydation des résidus cystéine. La production de

ROS va également augmenter celle d'une famille de lipides, les céramides (Quillet-Mary *et al.*, 1997), qui activeront les scramblases, facilitant ainsi l'externalisation des phosphatidylsérines (Lang *et al.*, 2005). Ces aspects sont développés dans la partie « marqueurs d'apoptose » de ce présent chapitre.

II.4.6. Enzymes lysosomales et apoptose

Les enzymes lysosomales interviennent également dans l'apoptose. En effet, dans le muscle *post-mortem*, les membranes des lysosomes sont fragilisées et les enzymes libérées, notamment les cathepsines B, L et D (Turk *et al.*, 2001). Ainsi, dans les cellules HeLa (lignée cellulaire cancéreuse utilisée en recherche médicale), la cathepsine D est capable d'activer différentes protéines des voies apoptotiques. Elle peut cliver les procaspases 9 et 3 et ainsi les activer. De même, elle facilite la libération du cytochrome c dans le milieu cytosolique activant ainsi les protéines Bid (qui devient t-Bid) et Bax. La procathepsine D, contenue dans les endosomes, est clivée par les céramides qui assurent également sa libération dans le cytosol (Heinrich *et al.*, 2004).

II.4.7. Stress/protéines de stress et apoptose

Il a été montré que les animaux stressés, présentent une viande plus dure que des animaux au comportement calme (Voisinet *et al.*, 1997 ; King *et al.*, 2006). La voie du stress cellulaire correspond à un cas particulier du stress quelle que soit sa nature, et qui conduit la cellule à synthétiser des protéines protectrices, les HSPs, ou protéines de stress ou protéines de choc thermique) capables de préserver l'ensemble des protéines cellulaires contre tous risques de dénaturation et de perte éventuelle de leur fonction (Kultz, 2003). Leur action freinerait la mise en place de l'apoptose, ce qui, pour certains auteurs, expliquerait pourquoi les animaux stressés présentent une viande plus dure.

Les protéines de stress ou *Heat Shock Proteins* (HSP) sont très nombreuses et classées en sous-familles sur la base de leur poids moléculaire : Hsp90, Hsp70, Hsp40, Hsp27, Hsp20, ...etc. Dans la cellule, ces protéines apparaissent dès que celle-ci se trouve en danger. Les HSPs ont un rôle essentiel puisqu'elles vont contribuer à la bonne conformation spatiale des protéines, conformation indispensable pour que ces dernières puissent assurer convenablement leur rôle. Il faut donc s'attendre à ce que ces protéines aient, lors d'une mort cellulaire programmée, une fonction antiapoptotique (Arrigo *et al.*, 2002 ; Beere, 2004 ; 2005 Arrigo, 2005 ; Flower *et al.*, 2005).

Les travaux de [Bernard et al. \(2007\)](#) ont montré une corrélation positive entre une meilleure tendreté et les niveaux transcriptionnels bas des gènes *DNAJA1* et *HSPB1* codant respectivement, les protéines Hsp40 et Hsp27. Il a été montré que le complexe *DNAJA1/HSP70* inhibe directement l'apoptose en empêchant la protéine proapoptotique *Bax*, qui lorsque transférée à la membrane mitochondriale, elle subit des changements conformationnels déclenchant la libération du cytochrome c, composant essentiel à l'activation de la voie intrinsèque de la caspase 9 ([Gotoh et al., 2004](#)). Le fort niveau d'activité de la caspase 9 retrouvé dans les premières heures suivant l'abattage indique que, la voie intrinsèque de l'apoptose est privilégiée. Enfin, les changements dans l'activité des caspases 3 et 7 se sont révélés être positivement associés avec le développement d'une viande plus tendre ([Kemp et al., 2006](#) ; [Kemp et al., 2010](#)).

Dans le phénomène d'apoptose, ces HSPs sont capables d'intervenir à différents niveaux :

- i) formation d'un complexe avec les caspases actives (initiatrices ou effectrices) les empêchant ainsi d'assurer leur fonction ;
- ii) Protection des protéines cibles (substrats) des caspases effectrices empêchant ou retardant ainsi leur dégradation par ces enzymes ;
- iii) Réparation ou tentative de réparation des protéines ayant subi des dommages structuraux suite au stress lui-même ou à l'initiation du processus apoptotique ou encore, à cause de l'action du stimulus qui est à l'origine de l'entrée en apoptose.

Le stress aura donc, au travers des HSPs, un ensemble d'actions, toutes de nature antiapoptotique. Il pourra en outre, dans les cas de stress intense, induire une mort cellulaire par la voie impliquant les mitochondries décrite précédemment ([Ouali et al., 2006](#)).

II.4.8. Variation des espaces intra- et extracellulaires et apoptose

D'autres travaux ont été consacrés à l'évolution *post-mortem* des espaces intra- et extracellulaires en relation avec les mouvements de l'eau dans le muscle et la rétention d'eau. L'acidification du muscle fait que la charge des protéines diminue et que celles-ci devenant progressivement plus hydrophobes vont fixer de moins en moins l'eau. Ceci est conforté par la corrélation très élevée observée entre l'augmentation de l'espace extracellulaire et le pH du muscle ([Guignot et al., 1993](#)). Le seul point qui demeurait jusqu'alors inexpliqué était le fait que l'augmentation de l'espace extracellulaire débutait dès la mort de l'animal alors que le pH était encore très proche de la neutralité.

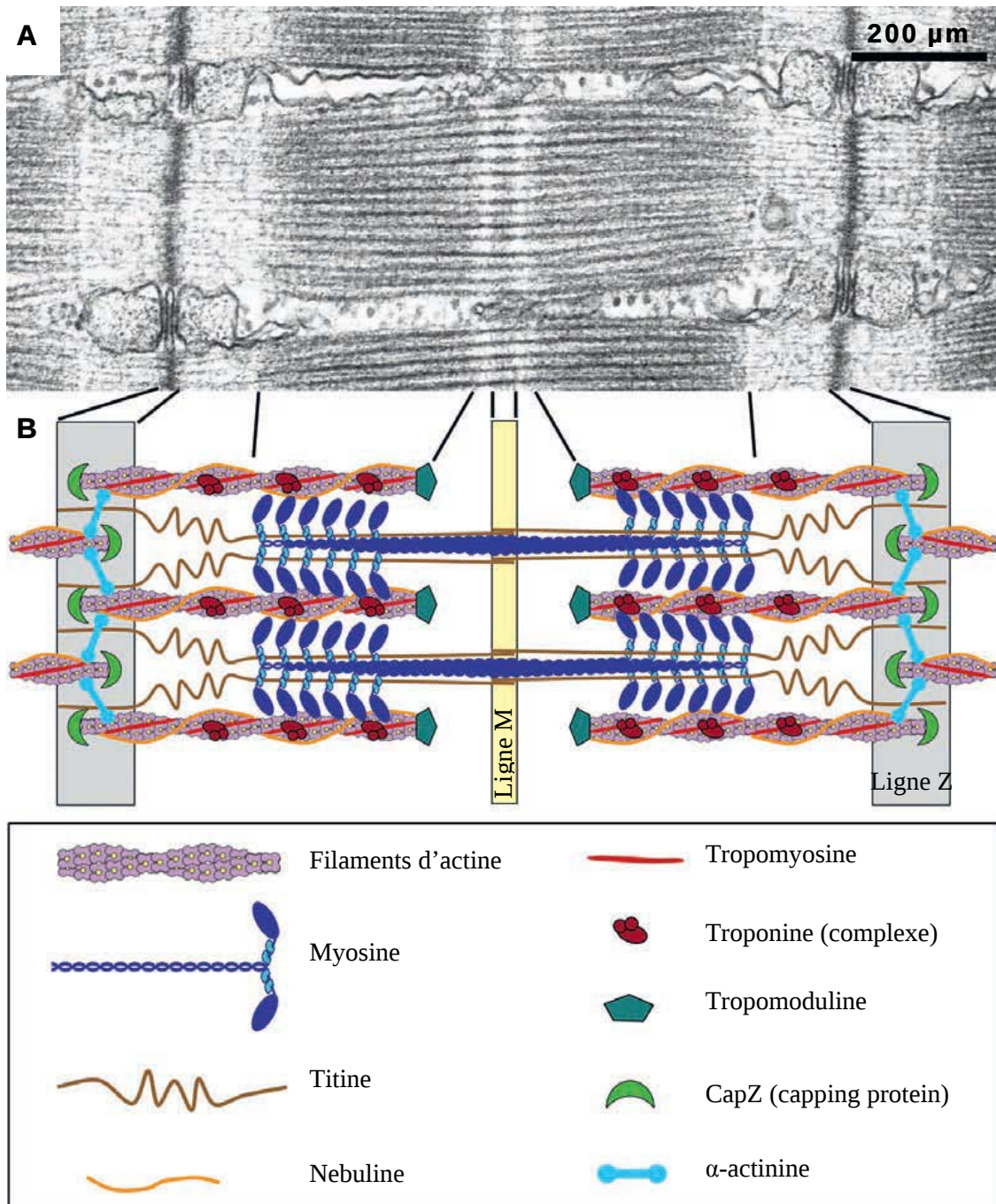


Figure 13. Organisation de l'actine dans le muscle strié (adapté de [Svitkina, 2013](#)).

A) Coupe fine sous microscopie électronique à transmission (TEM) du muscle *Sartorius* montrant l'organisation des sarcomères des fibres musculaires. Un sarcomère complet est représenté dans l'image.

B) Organisation moléculaire du sarcomère. Les lignes noires associent les zones correspondantes du micrographe et le diagramme schématique.

Les événements associés à la mort cellulaire fournissent aujourd'hui une explication puisqu'une cellule entrant en apoptose se dissocie des autres et se rétracte. La conséquence va être une diminution de l'espace intracellulaire et une augmentation parallèle de l'espace extracellulaire. [Becila et al. \(2010\)](#) ont confirmé que les cellules musculaires meurent par apoptose, et subissent une rétraction cellulaire intense d'environ 33 % évalué à 24h *post-mortem*. Le rétrécissement des cellules est discernable à 1 h *post-mortem* et même plus tôt selon des observations précédentes ([Ouali et al., 2007](#) ; [Ouali et al., 2013](#)).

II.5. Preuves de la mise en place de l'apoptose

Plusieurs chercheurs ont focalisé leur attention sur la compréhension des mécanismes impliqués dans les changements morphologiques dus à la mort cellulaire par apoptose. Différentes constatations viennent appuyer aujourd'hui la théorie de la mise en place de l'apoptose dans le muscle *post-mortem* ([Becila et al., 2010](#) ; [Cao et al., 2013](#) ; [Rodríguez-Frómata et al., 2013](#) ; [Zhang et al., 2013](#) ; [Ouali et al., 2013](#) ; [Zhang et al., 2013](#) ; [Sierra et Olivan, 2013](#) ; [Longo et al., 2015](#) ; [Huang et al., 2016](#)).

En premier lieu, une inversion de polarité est observée au niveau de la membrane cellulaire, provoquée par le changement d'orientation de certains constituants de la membrane plasmique, représentée par l'externalisation des phosphatidylsérines.

En second lieu, on assiste à une dégradation caspasique de certains composants clés du cytosquelette, particulièrement les filaments d'actine. Ces deux aspects seront développés et détaillés dans ce qui suit.

II.5.1. Dégradation de l'actine

II.5.1.1. Actine et ses fonctions

Les myofilaments fins sont constitués de 3 protéines : l'actine (20 – 25 % des protéines myofibrillaires totales), la tropomyosine et les troponines (Figure 13). L'actine est la seconde protéine la plus abondante des myofibrilles et elle est très abondante dans beaucoup de cellules eucaryotiques et son ubiquité est largement documentée. Le squelette d'actine constitué par les filaments d'actine et une myriade de protéines liées à l'actine est impliqué dans plusieurs fonctions cellulaires ([Svitkina, 2013](#)). Elle est impliquée dans les activités cellulaires qui exigent un mouvement ou un changement de conformation cellulaire, même partiellement ([Atencia et al., 2000](#) ; [Disanza et al., 2005](#)).

L'actine est une protéine globulaire possédant un acide aminé rare, la 3-méthyl histidine. L'actine a un poids moléculaire de ~ 43 kDa. Elle est constituée d'une chaîne polypeptidique hautement conservée (376 résidus) dont la séquence est connue. Elle existe sous deux formes, l'actine globulaire (actine G) sous forme de monomères dispersés qui peuvent s'assembler pour donner une forme filamenteuse (actine F) sous forme de polymères (Dingová *et al.*, 2009 ; Chhabra *et al.*, 2009). Les molécules au nombre de 350 environ sont placées bout à bout et forment deux brins torsadés en hélice (Figure 13). Les myofilaments fins sont formés par l'association de cette double hélice et de deux protéines régulatrices (Poirier *et al.*, 1999). Les filaments d'actine sont des structures polaires et ont donc deux extrémités structurellement et biochimiquement distinctes.

L'actine monomérique (actine G) majoritaire à une concentration ionique très basse, et des assemblages spontanés ont lieu juste après l'augmentation de la concentration ionique pour former l'actine filamenteuse (actine F). L'actine F, est une protéine cytosquelettique importante impliquée dans beaucoup de fonctions physiologiques, y compris la motilité, l'adhérence, la division cellulaire, l'endocytose, la phagocytose, l'établissement et le maintien de la polarité, le trafic intracellulaire et la morphogénèse des cellules et leur entretien (Chhabra *et al.*, 2009 ; Carlier et Pantaloni, 2010).

L'actine, qui est connue pour toutes ces fonctions et en particulier pour être un composant cytosquelettique, possède également d'autres fonctions au sein du noyau des cellules. L'actine nucléaire est impliquée dans divers processus tels que le remodelage de la chromatine, la régulation transcriptionnelle, les transports nucléaires (Vartiainen *et al.*, 2007), et la transcription des trois classes d'ARN polymérases eucaryotiques (Ye *et al.*, 2008). La variété de fonctions cytoplasmiques du cytosquelette d'actine est basée sur sa capacité d'adaptation aux diverses structures selon les conditions ioniques et l'interaction avec certaines protéines spécifiques (Pak *et al.*, 2008).

II.5.1.2. Dégradation de l'actine et apoptose

Le processus apoptotique se compose d'un ordre d'événements cellulaires finement régulés. Sans compter la dégradation de l'ADN nucléaire et l'activation des caspases, caractéristiques apoptotiques déjà citées, d'autres événements cellulaires sont impliqués. Parmi ces événements, consistant à dégrader des protéines cytosquelettiques au cours de l'apoptose et qui a suscité beaucoup d'attention est celui de l'actine (Atencia *et al.*, 2000). L'actine cytosquelettique, un élément essentiel de la cellule, semble être impliquée dans le

phénomène de la mort apoptotique des cellules ([Atencia et al., 2000](#)). Plusieurs études ont indiqué qu'elle est clivée pendant le phénomène d'apoptose ([Asumendi et al., 2000](#) ; [Bursch et al., 2000](#)). Le clivage de l'actine se produit en même temps que la dégradation d'ADN nucléaire ([Suarez-Huerta et al., 2000](#)).

Il est bien connu aujourd'hui que la dégradation de l'actine est le résultat d'un clivage protéolytique. Le rôle des caspases, a suscité une attention particulière en raison de leur implication dans l'initiation et l'exécution du phénomène d'apoptose. Plusieurs lignes d'évidence soutiennent ce rapport causal entre la rupture des filaments d'actine et l'apoptose :

- ☒ Premièrement, dans certaines cellules, chaque cellule ayant un noyau réduit en fragments, indicateur du changement d'ADN lors d'apoptose, montrent également, une désorganisation complète de l'actine F ([Van De Water et al., 1996](#)) ;
- ☒ Deuxièmement, la rupture cytosquelettique dans les cellules apoptotiques favorise les dommages de la membrane mitochondriale, et augmente la libération du Cyt c, activant la caspase 9, qui à son tour lance la cascade caspasique ([Yamazaki et al., 2000](#)) ;
- ☒ Troisièmement, il y a une association physique entre l'actine et la DNase I ([Kabsch et al., 1980](#)). L'actine intacte peut lier et séquestrer la DNase I, une endonucléase qui induit la fragmentation de l'ADN, de sorte que la rupture de l'actine active les DNases et provoque la dégradation nucléaire, une forte caractéristique de l'apoptose ([Kayalar et al., 1996](#)) ;
- ☒ Quatrièmement, le clivage cytosquelettique accélère ainsi l'activation de la caspase 3 ([Yamazaki et al., 2000](#)).

Le clivage de l'actine F par la caspase activée est étudié *in vitro* et *in vivo*, et les effets peuvent être empêchés par certains inhibiteurs de caspases ([Mashima et al., 1995, 1997, 1999](#)). Il a été constaté que la caspase activée, n'assure pas seulement la catalyse directe de la dégradation d'actine, mais active également d'autres enzymes intracellulaires qui, à leur tour attaquent l'actine intracellulaire ([Sabourin et al., 2000](#)). Le déclenchement des changements de l'actine F ayant lieu lors de l'apoptose varient avec le type de cellules et, selon les inducteurs apoptotiques considérés ([Suarez-Huerta et al., 2000](#)). Cependant, on admet que le clivage de l'actine F est un événement qui s'installe à un stade très précoce de l'apoptose ([Maruyama et al., 2000](#)).

Une autre étude a démontré la formation de filaments enrobés dans des corps apoptotiques ([van Engeland et al., 1997](#)). Dans les études montrant l'ordre de la cascade apoptotique, [Maruyama et al. \(2000\)](#) ont signalé que les changements cytosquelettiques sont parmi les

événements les plus précoces, précédant d'autres changements apoptotiques. Par ailleurs, il a été constaté que le processus de bourgeonnement ayant lieu dans les cellules apoptotiques, menant par la suite à la fragmentation des cellules, exige la neopolymérisation de l'actine (Suarez-Huerta *et al.*, 2000) et semble être dynamiquement régulé (Rao *et al.*, 1999). En outre, à la suite de son clivage, le fragment d'actine lui-même peut induire des changements morphologiques (Mashima *et al.*, 1999). Plusieurs études ont montré qu'il s'agit d'un changement biphasé.

II.5.1.3. Les peptidases apoptogènes (caspases) et clivage de l'actine

L'actine est bien connue comme un substrat des caspases (Kayalar *et al.*, 1996 ; Song *et al.*, 1997) et des calpaïnes (Brown *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 1998). Dans certaines cellules modèles, un lien direct entre la dépolymérisation d'actine et la dégradation de l'ADN a été ainsi suggéré (Kayalar *et al.*, 1996). Bien qu'elle présente une résistance au clivage *in vivo* dans certains modèles (Song *et al.*, 1997), le ciblage de l'actine et d'autres filaments intermédiaires est responsable en partie de la dégradation de la morphologie cellulaire pendant la phase exécutoire de l'apoptose.

Le lien qui existe entre la caspase 3 et l'actine a été largement étudié et il semble que la caspase 3 clive la gelsoline. Les fragments produits perturbent les filaments d'actine (Kothakota *et al.*, 1997).

Le *Gas2* (*growth arrest-specific gene*), un composant de la structure des microfilaments auquel l'actine se lie, est considéré comme substrat, et est clivé par la caspase 3 (Sgorbissa *et al.*, 1999). De plus, l'actine est clivée par la caspase (Figure 08c) principalement au niveau de deux emplacements, entre Asp¹¹ et Asn¹² et entre Asp²⁴⁴ et Gly²⁴⁵. Un site du clivage mineur entre Glu¹⁰⁷ et Ala¹⁰⁸ a également été identifié (Kayalar *et al.*, 1996).

II.5.1.4. Dégradation de l'actine *post-mortem*

Il a été suggéré qu'une dégradation potentiellement mineure d'actine pourrait se produire dans le muscle *post-mortem* (Sancho *et al.*, 1997 ; Lametsch *et al.*, 2002 ; 2003 ; Morzel *et al.*, 2004 ; Rodríguez-Frómata *et al.*, 2013 ; Rasolofoharitseheno *et al.*, 2015). La dégradation peut être mise en évidence par électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) à différents temps *post-mortem*, et les différents fragments peuvent être révélés par western blot par l'utilisation d'anticorps mono ou polyclonaux dirigés contre l'actine et ses fragments ou aussi par analyse protéomique couplée à la spectrométrie de masse.

Les caspases vont alors dégrader différents constituants de la cellule, notamment le cytosquelette. Ainsi, des protéines comme l'actine, la myosine, la spectrine, et la tubuline sont protéolysées. Cela mène à un affaissement de la cytostructure de la cellule, ce qui lui confère un aspect caractéristique au microscope photonique. Les fragments d'actine générés ont été proposés comme biomarqueurs potentiels de l'apoptose (Yang *et al.*, 1998) et aussi de la tendreté de la viande (voir Tableau 05 du chapitre IV).

La dégradation d'actine est associée à l'apoptose en considérant que sa dégradation précoce est assurée par les caspases. Un fragment de 32 kDa a été identifié par Becila *et al.* (2010), un résultat qui corrobore ceux obtenus par des études antérieures montrant un fragment de 32 kDa dans des cellules apoptotiques en culture (Yang *et al.*, 1998), dans le muscle *post-mortem* (Lametsch *et al.*, 2002 ; 2003 ; Morzel *et al.*, 2004) et sur l'actine pure hydrolysée par les caspases (Mashima *et al.*, 1995 ; Kayalar *et al.*, 1996). Récemment, des fragments de la dégradation d'actine ont été révélés par notre groupe en travaillant sur le muscle d'un poisson d'eau douce, *Cyprinus carpio* (Boudida *et al.*, 2015).

II.5.2. Externalisation des phosphatidylsérines

Lors du phénomène d'apoptose, la membrane plasmique forme des bourgeonnements à la surface des cellules. Celles-ci vont se disloquer en fragments cellulaires entourés d'une membrane phospholipidique, les corps apoptotiques, contenant des parties du cytoplasme et du noyau. Ces corps apoptotiques vont ensuite être rapidement éliminés par les cellules du système immunitaire, ce qui évite la libération du contenu cellulaire et le déclenchement d'une réponse inflammatoire locale. La reconnaissance de ces corps est facilitée par la translocation des phosphatidylsérines du feuillet interne de la membrane plasmique vers le feuillet externe (Bevers *et al.*, 1996; Krieser et White, 2002).

La membrane plasmique des cellules saines est caractérisée par une distribution asymétrique de diverses espèces de phospholipides au-dessus des deux feuillets de membrane (Figure 08d). Le feuillet intérieur, faisant face au cytosol, contient

- ☒ la phosphatidylsérine (PS) (qui est un composé acide) ;
- ☒ le phosphatidyléthanolamine (PE) et la phosphatidylcholine (PC) (deux composés basiques, se retrouvent du côté cytosolique).

Le feuillet externe, faisant face à l'environnement extérieur, héberge le phosphatidyléthanolamine (mais à un moindre degré que le feuillet intérieur), la phosphatidyl

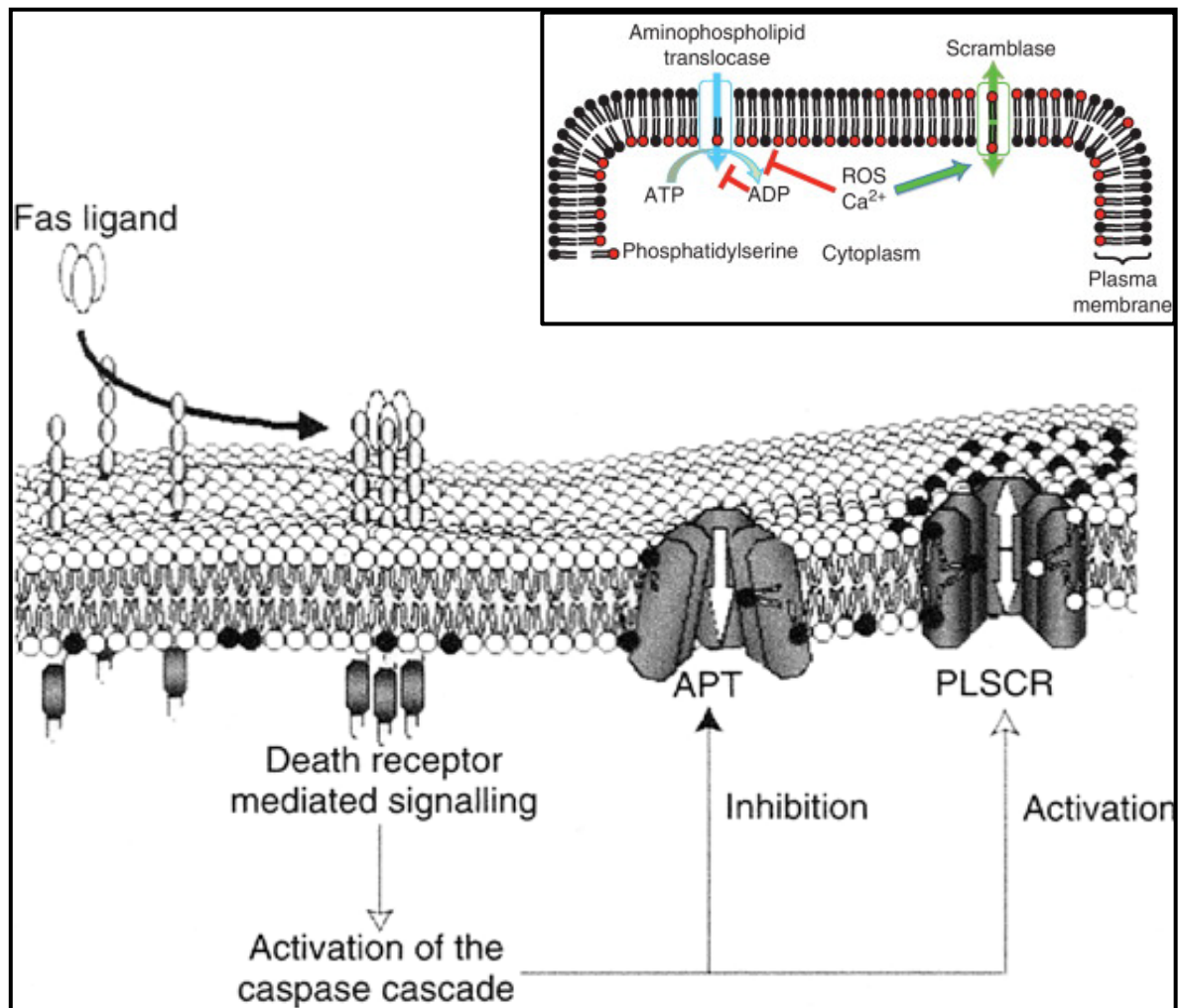


Figure 14. Schéma de l'asymétrie des phospholipides de la membrane plasmique ([van Genderen et al., 2003](#)).

La phosphatidylsérine est principalement située dans le feuillet intérieur dû à l'action de l'APT (*AminoPhospholipid Translocase*). L'activation de la cascade des caspases, par exemple à partir du ligand Fas, a comme conséquence l'inhibition de l'APT et l'activation des phospholipides de la scramblase (PLSCR). En conséquence, la phosphatidylsérine se présente au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique.

-choline et les sphingomyélines (SM). Cette asymétrie est produite et maintenue par des processus énergie-dépendants, qui se fondent sur l'activité d'une dite aminophospholipide translocase (APT) (van Genderen *et al.*, 2003 ; 2008).

Parmi les critères moléculaires permettant de distinguer une cellule apoptotique d'une cellule nécrotique ou normale, se trouve la membrane cellulaire, où une inversion de polarité est observée provenant du changement d'orientation de certains constituants. En effet, au cours de l'apoptose s'opère une altération de la perméabilité membranaire : on observe une asymétrie de la bicouche phospholipidique provoquée par la translocation de la phosphatidylsérine, de la membrane interne vers l'extérieur de la cellule. La phosphatidylsérine ainsi exposée pourra être détectée à l'aide d'un marqueur spécifique, l'annexine V (Becila *et al.*, 2010). L'annexine V couplée à la fluorescéine, en présence de calcium se lie avec une grande affinité à la phosphatidylsérine, l'un des phospholipides majeurs de la membrane cellulaire. Ce marquage FITC-annexine V, en plus d'une coloration d'exclusion au iodure de propidium (colorant vital) permet de distinguer par cytométrie de flux, les cellules apoptotiques, des cellules nécrotiques ou des cellules viables (van Genderen *et al.*, 2008).

Des translocases « scramblases », « flippases » et « floppases » sont responsables de l'ensemble de ces permutations. La présence de la phosphatidylcholine et de la phosphatidyléthanolamine permet de tamponner le milieu intracellulaire bloquant ainsi temporairement la chute du pH (Vance, 2008 ; Gagaoua *et al.*, 2015d). Ceci expliquerait les différents paliers de diminution du pH observés dans le muscle *Longissimus* d'animaux Charolais et des muscles d'agneaux ou du dromadaire, durant les dix premières heures suivant la mort de l'animal (Ouali *et al.*, 2006 ; Boudjellal *et al.*, 2008 ; Smili *et al.*, 2014).

L'externalisation des PS sur la surface des cellules est considérée comme un événement précoce du phénomène d'apoptose. Un tel phénomène a été mis en évidence dans le muscle du rat entre 1 et 24h *post-mortem* confirmant qu'après la saignée, les cellules musculaires meurent bien par le phénomène d'apoptose (Becila *et al.*, 2010). L'exposition des PS résulte de l'inhibition de l'activité des aminophospholipides translocase (APT) et de l'activation de l'activité des scramblases, ce qui explique l'exposition des PS dans les plaquettes activées (Verhoven *et al.*, 1995 ; Bratton *et al.*, 1997). Les PS extériorisées proviennent d'un pool de PS nouvellement synthétisés (Yu *et al.*, 2000). Il a été rapporté que le taux de la synthèse des PS est augmenté d'un facteur 2 durant l'apoptose (Aussel *et al.* 1998), bien qu'il n'y ait

aucune évidence directe que l'externalisation des PS soit exigée pour le déclenchement de l'apoptose.

Par ailleurs, l'apoptose produit des signaux qui agissent sur la membrane plasmique en inhibant l'APT et en activant la scramblase phospholipidique (PLSCR) (Figure 14). La combinaison de ces actions a pour conséquence l'apparition de la PS dans le feuillet externe de membrane tandis que l'intégrité de la membrane plasmique demeure intacte et n'est pas compromise. Il n'est pas encore bien connu comment la machine apoptotique inhibe l'APT et active la PLSCR. Il semble que la caspase 3 active n'agit pas directement sur ces complexes moléculaires mais probablement par des intermédiaires qui peuvent inclure un flux ionique calcique à travers la membrane plasmique (décrit ci-dessus), ou la protéine kinase C, ou le transporteur ABC-1 (van Genderen *et al.*, 2003). Enfin, La PLSCR transporte bi-directionnellement toutes les espèces de phospholipides de l'intérieur à l'extérieur du feuillet et *vice-versa* par un mécanisme d'ATP-dépendant. Ceci permet aux cellules apoptotiques d'être reconnues comme cibles par les macrophages afin de les phagocyter (Martin *et al.*, 1995 ; Bratton *et al.*, 1997 ; Matura *et al.*, 2005).

II.6. Inhibiteurs endogènes des protéases et la science de la viande

Les évolutions *post-mortem* des variables biologiques et de la dureté myofibrillaire de la viande varient énormément en fonction des animaux. Une cause possible de cette variabilité peut être la différence dans le contenu d'enzymes et plus probablement dans le rapport enzyme/inhibiteur, un paramètre reflétant l'efficacité des systèmes protéolytiques (Ouali, 1991 ; Valin, 1995).

En 1990, Ouali et Talmant mettaient en évidence que le taux d'inhibiteurs des protéases endogènes était un meilleur prédicteur de la tendreté de la viande que le taux des enzymes cibles elles-mêmes. Cette observation a conduit à une étude plus systématique des inhibiteurs dans le tissu musculaire pour essayer d'identifier ces derniers et de préciser la nature de leurs protéases cibles *in vivo*, susceptibles de jouer un rôle primordial dans le processus d'attendrissage des viandes (Ouali et Talmant, 1990). C'est le cas de la calpastatine (Ouali et Talmant, 1990), inhibiteur spécifique des calpaïnes ubiquitaires (μ - et m-calpaïnes) et, plus récemment, des inhibiteurs de sérine protéases (Zamora *et al.*, 1996 ; Zamora *et al.*, 2005). L'intérêt porté aux inhibiteurs est lié au fait que, s'il n'y a pas de relation directe entre le taux d'enzymes musculaires et la vitesse d'attendrissage, il existe en revanche une bonne corrélation entre cette même caractéristique et le rapport enzyme/inhibiteur.

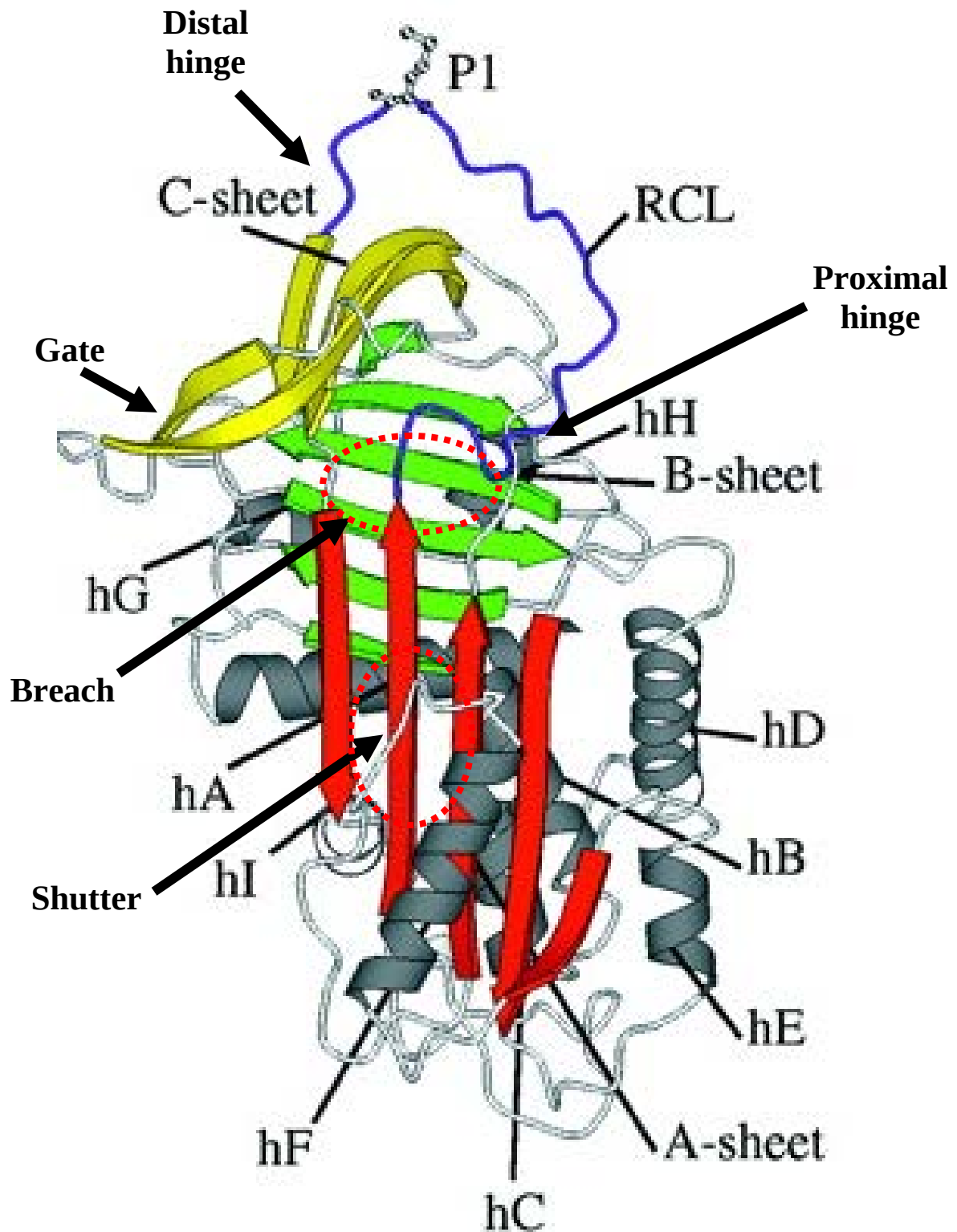


Figure 15. Structure d'une serpine (Adapté de [Silverman et al., 2001](#)).

Structure typique des serpins, exemple de l' α -AT native (SERPINA1 ; PDB code 1QLP), avec présence de trois feuillets β (feuillet A/rouge, feuillet B/vert et feuillet C/jaune), de neuf hélices α (hA – hI/gris) et d'une boucle d'inhibition ou RCL (*Reactive Center Loop*) (bleu). Le résidu qui confère la spécificité, nommé résidu P1, est aussi représenté au niveau de la boucle RCL.

Cette hypothèse a été soutenue par des résultats montrant que parmi 29 variables biologiques et physico-chimiques susceptibles d'expliquer la variabilité de l'attendrissage de la viande (la teneur en inhibiteurs des sérine protéinases, la vitesse de chute de l'activité μ -calpaïne, l'amplitude et la vitesse de chute du pH, l'amplitude d'augmentation de l'osmolarité, le métabolisme glycolytique des muscles,...), la teneur en inhibiteurs de sérine protéinases occupait la première place et leur taux dans le tissu musculaire était le meilleur indice de prédiction de la tendreté de la viande (Zamora *et al.*, 1996; 2005).

Au plan quantitatif, la grande majorité de ces inhibiteurs étaient des serpinines. Les serpinines (acronyme pour serine protéinases inhibitors), représentent une classe de protéines inhibitrices capables d'inactiver à la fois les sérines et les cystéines protéinases. Elles sont largement répandues dans les tissus et cellules de mammifères étudiés à ce jour (Silverman *et al.*, 2001). Cependant, peu de données sont actuellement disponibles concernant le muscle squelettique.

II.6.1. Bref aperçu sur les serpinines

Dans ce qui suit je donnerai un bref aperçu de la superfamille des serpinines largement repris d'une large revue bibliographique réalisée dans le cadre de mon magistère (Gagaoua, 2011).

L'identification et la découverte de la superfamille des serpinines remontent aux années 80, lorsque Hunt et Dayhoff ont noté des homologies de séquences de 30 – 50% entre deux protéines sériques : l'antithrombine et l' α_1 -antitrypsine (α_1 -AT ou α_1 -PI), et l'ovalbumine une protéine du blanc d'œuf (Hunt et Dayhoff, 1980). Carrell et Travis ont introduit pour la première fois le terme SERPIN pour désigner au départ la famille des inhibiteurs de protéinases à sérine du plasma (Carrell et Travis, 1985).

Depuis, la caractérisation génétique a révélé un large groupe de gènes appartenant à cette superfamille qui dérivent probablement d'une duplication génétique d'un gène ancestral commun il y'a environ 500 millions d'années (Carrell *et al.*, 1987).

La superfamille des serpinines constitue la plus grande classe des inhibiteurs de protéases à sérine/cystéine connue (Silverman *et al.*, 2010). Actuellement, elle englobe plus de 3000 membres distribués dans les trois règnes du monde du vivant, les archaebactéries (Archées), les eubactéries et les eucaryotes, ainsi que dans quelques virus (Olson et Gettins, 2011).

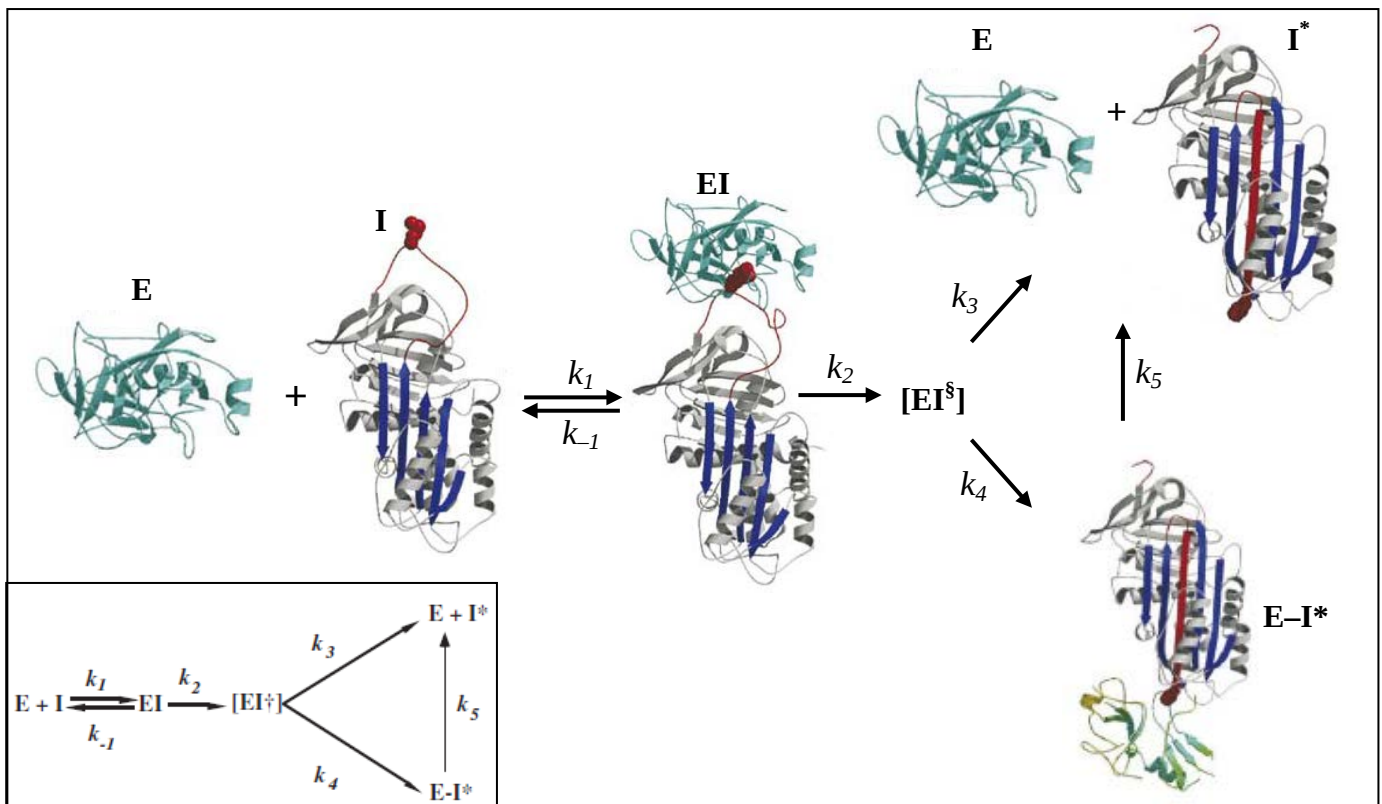


Figure 16. Mécanisme d'inhibition des serpins (Huntington, 2011 ; Olson et Gettins, 2011).

La protéase (E) (Trypsine, cyan) reconnaît des résidus situés dans la boucle du RCL (rouge) de la serpine (I) et s'associe, avec une constante d'association de second ordre k_1 , pour initier la formation du complexe Michaelis non-covalent (EI) en interagissant avec les résidus P1 et P1' de la boucle, sans avoir recours au changement conformationnel majeur. Ce complexe peut se dissocier avec une constante d'association notée k_{-1} , mais le complexe possède plus de chance d'aller plus loin (vu que $k_2 \gg k_{-1}$). La sérine du site actif de la protéase attaque la liaison peptidique entre P1 et P1' comme s'il s'agissait d'un substrat (*pseudosubstrat*), ce qui aboutit à la formation d'une liaison covalente entre cette sérine et le résidu P1, puis la coupure de la liaison peptidique entre P1 et P1' et aboutit à la formation d'un intermédiaire acyl-enzyme ($\text{EI}^\ddagger$). Le clivage du RCL déclenche une modification dramatique de la conformation de la serpine. Deux résultats sont possibles et sont en concurrence l'un avec l'autre. Le premier est l'insertion complète et immédiate, du RCL clivé dans le feuillet β A pour former un brin β additionnel. Ce mouvement permet d'entraîner avec lui la protéinase (E) du pôle de la serpine à l'autre, ce qui correspond à un déplacement relatif d'environ 70 Å, donnant le complexe covalent enzyme/inhibiteur (E-I^*). Ce piégeage se produit avec une constante d'association, k_4 . Cependant, si la protéase peut accomplir la réaction d'hydrolyse avant que son activité soit entièrement compromise, des produits de la serpine clivée (I^*) et de la protéase libre sont formés, avec une constante d'association de k_3 . Le rapport (k_3/k_4), aboutit à la « stœchiométrie d'inhibition » (SI), représentant le nombre de moles de serpine exigés pour former 1 mole du complexe covalent. Enfin, puisque le complexe covalent est seulement un intermédiaire cinétiquement emprisonné, il peut encore former les mêmes produits d' I^* et d'E par une hydrolyse non catalytique, avec une constante d'association de k_5 .

Les serpins sont des glycoprotéines globulaires, composées de chaînes de polypeptides et d'un nombre variable d'oligosaccharides (Potempa *et al.*, 1994), d'un poids moléculaire compris entre 40 et 60 kDa et ayant des séquences variant de 350 – 400 acides aminés (Irving *et al.*, 2000 ; Gettins, 2002).

Ainsi, une serpine est constituée de 3 feuillets β (A (cinq), B (six) et C (cinq)), constituant le corps de la molécule, alors que les hélices et les boucles entourant ces structures, consolident la structure tertiaire (Pearce *et al.*, 2007). On distingue 8 à 9 hélices α (hA à hI) et une boucle d'inhibition mobile d'environ 20 résidus exposée à la surface, située à l'extrémité C-terminale, (Figure 15) reconnue par la protéase cible et appelée RCL (*Reactive Center Loop*). La longueur du RCL varie entre les différentes serpins et dicte principalement la spécificité inhibitrice (Huntington, 2011 ; Olson et Gettins, 2011 ; Gettins, 2002).

Les serpins présentent une conformation changeante, ou flexible, qui assure un mécanisme d'inhibition des protéases unique mais qui leur confère aussi une instabilité structurale forçant leur transition vers des formes latentes ou polymériques non actives (Huntington, 2011; Whisstock *et al.*, 2010).

Contrairement au dogme du repliement des protéines qui veut que la chaîne peptidique se replie en divers intermédiaires jusqu'à l'obtention de la structure thermodynamique la plus stable, les serpins, dans leur repliement natif, restent piégées par une barrière cinétique dans un état de plus haute énergie, nommé « métastable » (Whisstock *et al.*, 2010). Cette barrière cinétique est franchie lors de l'interaction de la serpine avec une protéase, conduisant à l'inhibition de cette dernière. Cette conformation native, ou « stressée, S », est très instable sur le plan thermodynamique. Lorsque la protéase se fixe sur le RCL, celui-ci s'insère dans le feuillet β A, formant ainsi le quatrième brin (s4A) et la serpine adopte une conformation « relaxée, R » beaucoup plus stable (Boudier et Bieth, 2001).

Les serpins inhibent leurs protéases cibles par un mécanisme spécifique suicide – substrat conduisant à la formation d'un complexe irréversible ($E + S \rightarrow ES$) illustré dans la Figure 16. Leur interaction avec les protéases cibles est nettement plus complexe, puisque elle implique certaines modifications structurales très importantes (Gettins, 2002 ; Olson et Gettins, 2011).

Des résidus situés dans la boucle d'inhibition (RCL) de la serpine (**I**) sont reconnus comme substrat par la protéase (**E**), qui clive le RCL et s'associe à la serpine via un intermédiaire acyl-covalent (Silverman *et al.*, 2001), avec une constante d'association de second ordre k_1 , pour initier la formation du complexe Michaelis non-covalent (**EI**) en interagissant avec les résidus P1 et P1' de la boucle, sans avoir recours à un changement conformationnel majeur.

La serine 195 de la triade catalytique de la protéase attaque ensuite la liaison peptidique entre P1 et P1' comme s'il s'agissait d'un substrat (*pseudosubstrat*), formant ainsi une liaison acyle-ester covalente entre la serine et la fonction carbonyle du résidu P1 ; puis la coupure de la liaison peptidique entre P1 et P1'. Ceci aboutit à la formation d'un intermédiaire acyle-enzyme (**EI**⁸) stable thermodynamiquement. Le clivage de la boucle déclenche une modification dramatique de la conformation de la serpine ; elle passe de la conformation stressée (S) à la conformation relaxée (R) plus stable thermodynamiquement (Gettins, 2002 ; Gettins, 2007). La transition S→R est dépendante de la région charnière du RCL.

Cependant, si l'insertion du RCL dans la molécule n'est pas suffisamment rapide, une déacylation du complexe survient et la réaction emprunte la voie du substrat, c'est-à-dire que la protéase peut accomplir la réaction d'hydrolyse avant que son activité soit entièrement compromise, ou il y'a formation de la serpine clivée (**I***) (inactive) et de la protéase libre (active) (Lawrence *et al.*, 2000), avec une constante d'association k_3 . Le rapport (k_3/k_4), aboutit à la « stœchiométrie d'inhibition » (SI), représentant le nombre de moles de serpine exigés pour former 1 mole du complexe covalent. Enfin, puisque le complexe covalent est seulement un intermédiaire cinétiquement emprisonnée, il peut encore former les mêmes produits d'**I*** (inactif et stable) et d'**E**, avec une constante d'association de k_5 (Gettins, 2007).

II.6.2. Les serpines dans le muscle

Bien que l'existence des inhibiteurs dans le muscle ait été révélée dans les années 1970 (Nogushi et Kandatsu, 1969), peu de travaux ont été réalisés sur le tissu musculaire. Dès 1981, Dalhmann et ses collaborateurs ont isolé à partir de muscle squelettique de rat, des inhibiteurs de sérine protéinase qui pourraient avoir un rôle dans le contrôle de l'activité protéolytique intracellulaire (Dalhmann *et al.*, 1981). Juste après, quatre activités inhibitrices dans la fraction cytosolique du muscle squelettique de rat ont été mises en évidence (Kuehn *et al.*, 1984). Trois de ces activités correspondent à des protéines de 50, 65 et 65 kDa et sont des homologues de la famille des serpines purifiées à partir du sérum de rat. L'autre fraction, qui n'a été caractérisée que très partiellement, présente un poids moléculaire voisin de 15 kDa.

D'autres ont été aussi isolées dans le muscle de plusieurs espèces, chez les poissons (Toyohara *et al.*, 1983 ; Yanagihara *et al.*, 1991) et le poulet (Kim *et al.*, 1992).

Dans le tissu musculaire, différentes serpins ont été identifiées, dont certaines localisées au niveau de la jonction neuromusculaire. C'est le cas de la Protéase Nexin-1, un inhibiteur de la thrombine synthétisé uniquement après la fusion des myoblastes en myotubes (Festoff *et al.*, 1991 ; Akaaboune *et al.*, 1998) ; l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI) (Fibbi *et al.*, 2001) ; la kallistatine qui se lie à la kallikréine (Richards *et al.*, 1997) ; l' α_1 -ACT (SERPINA3) ; la kunine et la Protease Nexin II, connue sous le nom de précurseur de la protéine β -amyloïde (Akaaboune *et al.*, 1998).

Parmi les séries des inhibiteurs à sérine fractionnés du muscle squelettique bovin (Ouali *et al.*, 1995 ; Rouchon, 1995 ; Tassy, 1998), deux serpins ont été purifiées et identifiées par leurs séquences N-terminal comme l'antithrombine III et l'Endopine (Tassy, 1998). Deux autres serpins de la famille des SERPINA3 ont été extraites et caractérisées biochimiquement (Tassy *et al.*, 2005 ; Herrera-Mendez *et al.*, 2006b). Ces deux serpins initialement nommées mEndopine 1A et 1B sont aujourd'hui répertoriées dans les banques de données sous le nom de bovSERPINA3-1 et bovSERPINA3-3, respectivement (Pélissier *et al.*, 2008). Le gène codant cet inhibiteur, a été identifié et séquencé, il est constitué de 4 exons et 3 introns (Péré-Brissaud *et al.*, 2015). Il s'agit en fait de deux membres d'une famille complexe de serpins (bovSERPINA3-1, ..., bovSERPINA3-8), qui partagent une identité proche de 93%. Ces deux anti-protéases, bien que très proches structuralement, présentent des variations en acides aminés, en particulier au niveau du site actif de leur RCL (Herrera-Mendez *et al.*, 2006b). Elles sont également différentes de par leur degré de glycosylation qui peut justifier les modifications retrouvées au niveau des profils d'inhibition mesurés sur différentes classes de protéases commerciales (Blanchet *et al.*, 2012). Par exemple, la serpine bovSERPINA3-3 possède une poids moléculaire d'environ 75 kDa supérieure à sa masse théorique d'environ 47 kDa.

En 2008, il a été montré que les serpins A3 bovines sont composées d'au moins 9 membres qui possèdent la capacité d'inhiber la chymotrypsine, la trypsine, l'élastase et la plasmine, ainsi que les caspases 3 et 8 considérées comme protéases de type cystéine intervenant dans l'apoptose (Pélissier *et al.*, 2008 ; Herrera-Mendez *et al.*, 2009 ; Gagaoua *et al.*, 2012 ; 2013a). L'ensemble de ces gènes est localisé sur un fragment d'ADN d'environ 200 kpb situé dans le locus q24 du chromosome 21 (Pélissier *et al.*, 2008).

Chapitre III

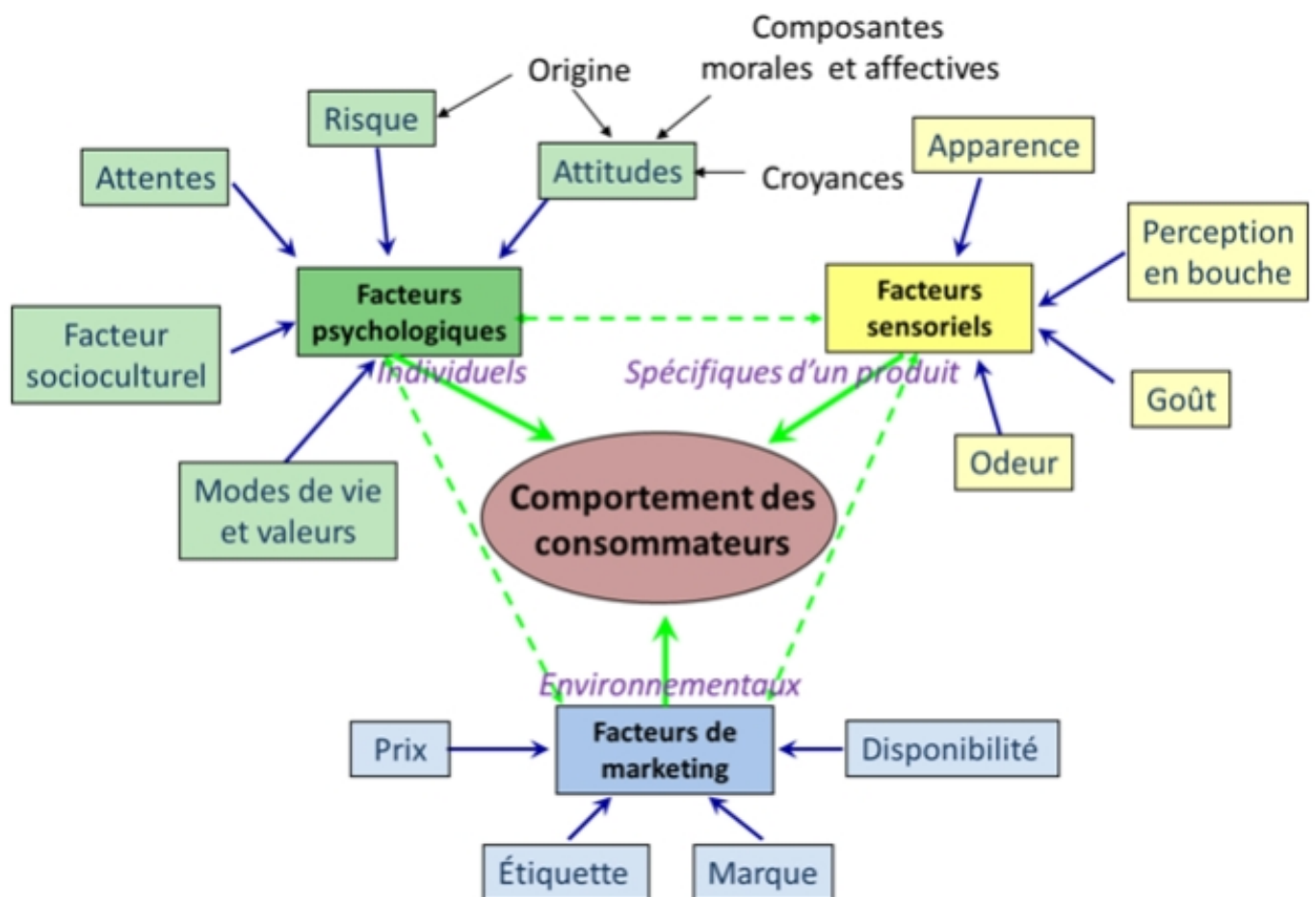


Figure 17. Facteurs influençant les comportements des consommateurs. Le cas de la viande selon [Font-i-Furnols et Guerrero \(2014\)](#).

Chapitre III

« Qualités sensorielles de la viande bovine et conséquences de sa variabilité »

III.1. Qualités de la viande

La qualité est l'ensemble des propriétés et caractéristiques d'un service ou d'un produit qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire les besoins exprimés ou implicites des consommateurs de ce service ou de ce produit (Luning et Marcelis, 2006). La qualité de la viande est définie par différents critères que sont la valeur nutritionnelle, l'hygiène ou encore la palatabilité (Hocquette *et al.*, 2012).

La composante nutritionnelle de la qualité est déterminée essentiellement par la composition chimique du tissu musculaire au stade d'abattage, alors que les composantes technologique et sensorielle résultent d'interactions entre la composition chimique et les propriétés métaboliques du muscle à l'abattage, et son évolution *post-mortem*, conduisant à sa conversion en viande (Listrat *et al.*, 2015). La palatabilité de la viande bovine, c'est-à-dire la caractéristique de sa texture et les préférences des consommateurs, est une perception assez subjective. Elle est liée aux ressentis de chacun et dépend fortement des habitudes de consommation du pays ou de la région du globe (Grunert *et al.*, 2004 ; Font-i-Furnols et Guerrero, 2014) dont la viande est originaire (Figure 17). Les qualités sensorielles des viandes bovines dépendent de facteurs liés à l'animal (âge, race, sexe, génotype), au mode d'élevage (vitesse de croissance, alimentation) ou aux facteurs technologiques *post-mortem*, qui induisent des modifications des caractéristiques biologiques du muscle (fibres musculaires, trame conjonctive et lipides intramusculaires) et par conséquent des variations des qualités recherchées de la viande.

Les caractéristiques sensorielles des viandes sont déterminées par des jurys entraînés qui évaluent dans des conditions définies et normalisées (ISO 8589, 2010) : l'intensité de différents caractères descriptifs d'aspect, de texture et de flaveur (odeur, goût) ou par des mesures objectives en utilisant des instruments dédiés.

Dans ce qui suit, seront présentées les principales qualités sensorielles de la viande : la couleur, la tendreté, la flaveur et la jutosité (Touraille, 1994).

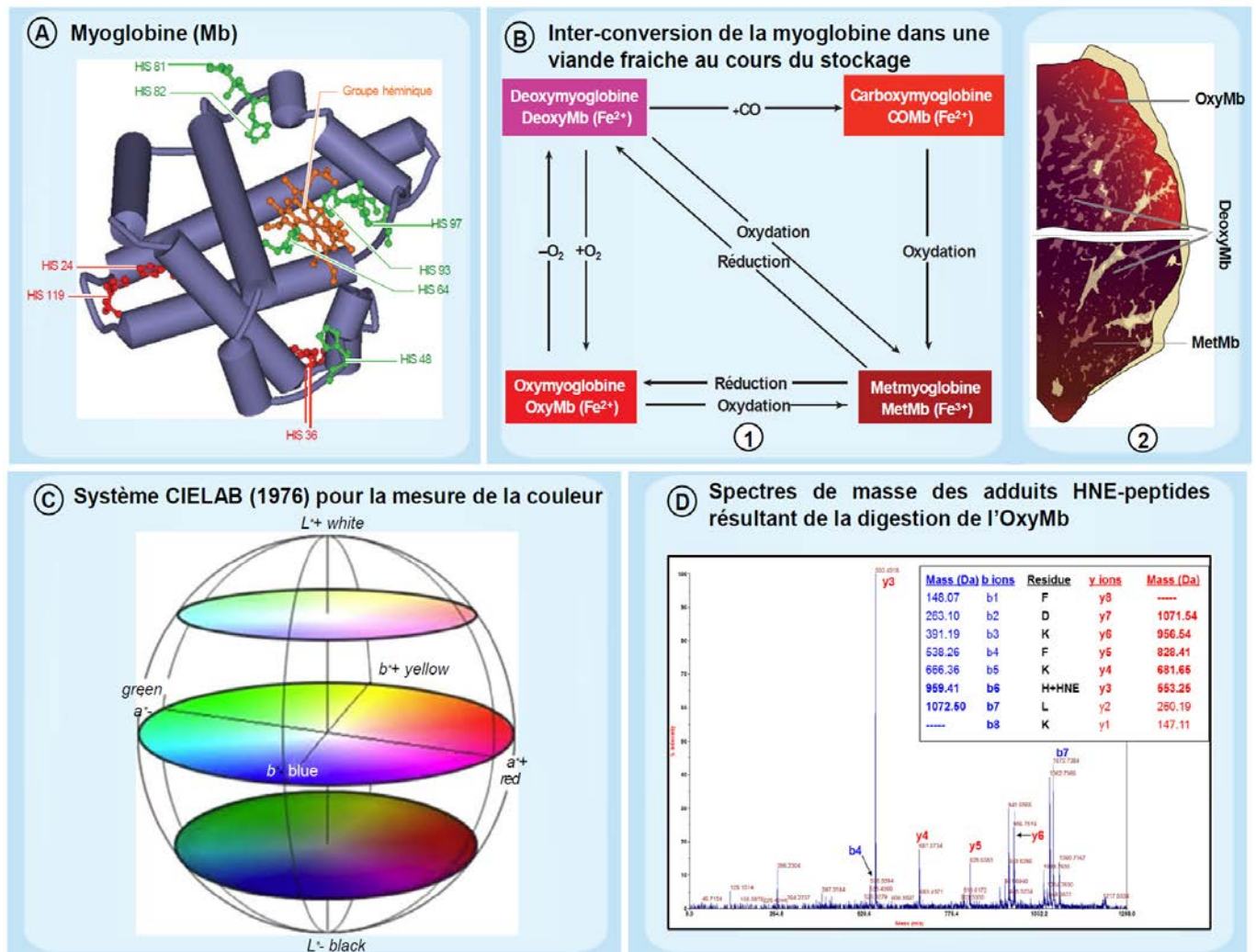


Figure 18. La myoglobine et la couleur de la viande.

- A)** Structure tridimensionnelle de la myoglobine (Mb) montrant son groupe héminique central.
- B)** Interconversion de la myoglobine dans une viande fraîche en réponse à un stimulus comme l'oxydation ou la réduction de son groupe héminique.
- C)** Représentation du système CIE- $L^*a^*b^*$ pour la mesure de la couleur de la viande.
- D)** Exemple de spectre de masse des adduits de peptides-HNE, un résultat de la digestion trypsique de l'OxyMb.

III.2. La couleur

La couleur de la viande est la première caractéristique perçue par le consommateur et souvent la seule dont il dispose pour choisir la viande au moment de l'achat. La couleur qui s'altère rapidement au cours de la conservation, est généralement associée au degré de fraîcheur de la viande. Elle est due en partie à la teneur et à l'état chimique du pigment essentiel, la myoglobine (Mb) (Figure 18a), dont le rôle est de capter l'oxygène véhiculé par l'hémoglobine sanguine et de le transporter dans le muscle ([Rennerre, 1990](#) ; [Mancini et Hunt, 2005](#)). La Mb contient un noyau héminique composé d'un noyau de fer central permettant le dosage quantitatif du pigment (Figure 18a). Au sein du muscle, la Mb est sous forme réduite, de couleur pourpre, en raison de l'absence d'oxygène (Figure 18b). En surface, au contact de l'air, elle se trouve sous forme oxygénée, oxymyoglobine (OxyMb), de couleur rouge vif, couleur appréciée lors de l'achat (Figure 18b). Après une exposition prolongée à l'air, cette couleur est instable car le pigment s'oxyde en metmyoglobine (MetMb), de couleur brunâtre, désagréable à l'œil de l'acheteur, qui peut induire une réaction de rejet lors de l'achat ([Mancini, 2009](#) ; [Suman et Joseph, 2013](#)).

Par ailleurs, les différentes fibres musculaires possèdent des teneurs variables en Mb suivant qu'il s'agisse d'un muscle à caractère oxydatif (riche en Mb) ou glycolytique (pauvre en Mb). La proportion de ces différents types de fibres au sein d'un muscle influence donc directement sa couleur. L'oxydation de la Mb dans des viandes à proportion élevée de fibres de type I détériore la stabilité de la couleur rouge en induisant la formation de MetMb ([Rennerre 1990](#)). La couleur est aussi liée à la structure du muscle réfléchissant la lumière, elle-même influencée par l'évolution du pH. L'abaissement du pH augmente la quantité d'eau extracellulaire et, en conséquence, la réflexion de la lumière incidente ([Offer et al., 1989](#)), ce qui confère un aspect clair aux viandes à bas pH. Le degré d'acidité de la viande joue un rôle important dans l'absorption de la lumière et influence donc la luminosité de la viande.

Outre l'évaluation sensorielle par un jury, la couleur peut être estimée objectivement par mesure avec un chromamètre de type Minolta ([Mancini, 2009](#)). L'appareil décompose la couleur dans un espace tridimensionnel (CIE- $L^*a^*b^*$) caractérisé par la luminance (L^*) et deux axes de nuances (bleu-rouge, (a^*) pour l'indice de rouge et vert-jaune, (b^*) pour l'indice de jaune permettant de calculer la saturation (C^*) et la teinte (h°), cette dernière étant le paramètre colorimétrique le mieux corrélé à l'intensité de couleur rouge estimée par un jury.

III.3. La tendreté

La tendreté est considérée comme une propriété sensorielle qui traduit la facilité avec laquelle la structure de la viande peut être désorganisée au cours de la mastication (Ouali *et al.*, 2006). A l'opposé, la dureté de la viande exprime la résistance qu'elle offre au tranchage ou à la mastication. La tendreté de la viande, principalement pour la viande bovine, est sans aucun doute le critère le plus important lorsqu'il est question de qualité sensorielle pour le consommateur (Grunert *et al.*, 2004). Deux facteurs structuraux principaux de la viande contrôlent la tendreté : **i)** chez le bovin en particulier, le tissu conjonctif, par son abondance et sa nature et **ii)** dans toutes les espèces, la structure myofibrillaire, par son état de contraction et son amplitude d'attendrissage après abattage (Lebret et Picard, 2015). Or, cette qualité, d'origine multifactorielle, présente une forte variabilité non maîtrisée qui induit une insatisfaction des consommateurs la jugeant décevante et irrégulière.

L'attendrissage de la viande au cours de sa conservation à l'état réfrigéré est le résultat d'une altération des structures musculaires et de la structure myofibrillaire plus particulièrement, par les protéases endogènes. Le tissu conjonctif évolue très peu durant cette phase, mais confère au muscle sa dureté de base (Figure 08a). Différents systèmes protéolytiques semblent être impliqués dans ce processus de dégradation de la structure contractile dont les plus connus sont les calpaïnes, les cathepsines, le protéasome, les serine protéases et, plus récemment les caspases, famille de cystéine protéases responsables de la dégradation des structures cellulaires dans le cadre de la mort des cellules par apoptose abordé dans le chapitre précédent (Sentandreu *et al.*, 2002 ; Koohmaraie *et al.*, 2002 ; Ouali *et al.*, 2006).

La mesure de la tendreté est possible grâce à deux grands types d'analyses (Figure 35, partie méthodologie) : l'évaluation sensorielle, où l'analyse s'effectue par un jury entraîné ; et des méthodes instrumentales (méthode objective), dont le principe est soit une déformation du produit avec mesure des forces mises en jeu (mesure directe), soit un dosage des composés responsables des variations de texture (mesure indirecte).

Les méthodes de mesures physiques de la tendreté font appel à des instruments qui tentent de simuler certaines sensations du consommateur pendant la mastication, puis de les mesurer. Il s'agit pour la plupart, de tests mécaniques qui mesurent la résistance ou l'amplitude de la déformation du produit à différents types de forces qui lui sont appliquées. Selon le cas, ces mesures sont réalisées sur des échantillons de viande crue ou cuite.

De nombreux tests mécaniques sont disponibles pour mesurer la dureté de la viande, par exemple : le test de cisaillement, de compression, de tension, de morsure, la pénétrométrie et le découpage par lames multiples (Lepetit et Culioli, 1994 ; Evrat-Georgel, 2008).

La mesure des forces de cisaillement est la plus répandue. Elle consiste à mesurer la contrainte nécessaire pour faire passer une arête tranchante à travers un morceau de viande perpendiculairement aux fibres musculaires (Evrat-Georgel, 2008). En pratique, les appareils de mesure développés prennent en compte deux facteurs : d'une part, les myofibrilles qui sont compressées et se déplacent latéralement sous l'effet de cette pression, et d'autre part, le tissu conjonctif qui est cisailé. Le test de Warner-Bratzler (WB) est le test le plus utilisé à travers le monde pour mesurer la tendreté de la viande. C'est un test direct de mesure de la résistance de la viande. Son application sur la viande cuite permet de se rapprocher des attentes des consommateurs.

La tendreté de la viande est la résultante de nombreux facteurs, et donc son évaluation ne peut être réduite à ce seul paramètre mécanique. C'est pourquoi dans de nombreuses études, l'analyse sensorielle, faisant intervenir un jury de dégustateurs entraînés à juger la qualité des viandes dont la tendreté, est préférentiellement employé. C'est la méthode la plus directe qui consiste à examiner les propriétés sensorielles et la qualité hédonique de la viande par les organes des sens (Evrat-Georgel, 2008). Malgré les contraintes qu'elle implique (nombre de juges, quantité de viande à tester, coût élevé, répétabilité moyenne) elle est considérée comme la méthode de référence, à laquelle les méthodes instrumentales sont comparées.

III.4. La flaveur

La flaveur de la viande est le résultat complexe des sensations olfactives, gustatives et trigéminales perçues. Elle fait appel à deux sens, le goût et l'odorat. La « flaveur typique » est déterminée par la composition chimique de la viande et notamment par la teneur en lipides intramusculaires. Le type de fibres a également un rôle déterminant pour l'intensité de la flaveur. Les fibres rouges lentes, présentant un métabolisme oxydatif, induisent en effet une meilleure flaveur car elles métabolisent et stockent une quantité plus élevée d'acides gras que les fibres blanches (Touraille, 1994). La flaveur de la viande dépend aussi des changements biochimiques au cours de la cuisson. De nombreux composés aromatiques volatils sont en effet produits à partir de différents précurseurs, composés hydrosolubles et lipidiques, durant le traitement thermique de la viande.

Deux types de réactions se produisent au cours de la cuisson : les réactions de Maillard entre les acides aminés et les sucres réducteurs, et la dégradation des lipides, triglycérides et phospholipides. Les principaux composés hydrosolubles précurseurs d'arômes sont les sucres (le ribose), les acides aminés libres (la cystéine), les peptides, les nucléotides ainsi que les composés azotés telle que la thiamine. La composition en acides gras des lipides joue également un rôle important dans la détermination de la flaveur de la viande.

En effet, la teneur en lipides intramusculaires est un facteur primordial dans la détermination de la flaveur de la viande. Si ce taux est inférieur à la valeur seuil déterminée pour l'espèce concernée, la viande n'est plus caractérisée par une flaveur spécifique (Hocquette *et al.*, 1998). La teneur optimale en lipides intramusculaires pour l'obtention de caractéristiques sensorielles favorables est de 2,5 à 3,0% dans le muscle *Longissimus* de porc (Fernandez *et al.*, 1995, 1999a,b), elle est estimée à 4% de gras intramusculaire pour le bovin et serait même préjudiciable à la flaveur des viandes au-delà de 10% (Hocquette *et al.*, 2010).

Les composés aromatiques résultent de l'oxydation des lipides, mécanisme favorisé par la présence d'acides gras insaturés. Ainsi, les phospholipides, qui contiennent une proportion plus importante d'acides gras insaturés que les triglycérides, sont une source importante de composés volatils (Mottram, 1998). Toutefois, l'oxydation des lipides peut conduire à des odeurs de rancie, notamment dans le cas d'une cuisson lente à basse température ou lors d'une conservation prolongée de la viande (Campo *et al.*, 2006). Par ailleurs, des produits formés durant la dégradation des lipides participent également aux réactions de Maillard et sont à l'origine d'autres composés volatils caractéristiques des viandes grillées. La flaveur très différente d'un muscle à un autre (Monin, 1991) dépend en particulier du type métabolique. Enfin, il est important de préciser que le déterminisme exact de la flaveur est complexe et non totalement élucidé, notamment en raison des nombreux composés impliqués.

III.5. La jutosité

La jutosité est un paramètre de qualité sensorielle qui se perçoit lors de la mastication. Elle représente le caractère plus ou moins sec de la viande consommée. On distingue la jutosité initiale, qui est perçue au premier coup de dent, et la jutosité soutenue. La première est surtout liée à la quantité d'eau libérée lors de la mastication, la seconde est plutôt en relation avec la stimulation de la salivation engendrée par la présence de lipides dans la viande (Campo *et al.*, 2006). La jutosité est exclusivement mesurée par un jury de dégustation.

Le facteur essentiel influençant la jutosité est le pouvoir de rétention en eau du muscle. Le pH de la viande est également déterminant pour la jutosité. Une viande à pH bas aura tendance à perdre son eau et donc à être sèche, alors qu'une viande de pH élevé aura une très bonne rétention d'eau et présentera une jutosité supérieure, ceci tant pour les viandes blanches (Monin, 1988) que les viandes rouges (Touraille, 1994). Le pouvoir de rétention d'eau peut donc être une alternative à la mesure de la jutosité car c'est une caractéristique de la viande importante à plusieurs titres : aspect du produit cru, perte à la cuisson, jutosité du produit cuit. La jutosité reste le critère le moins étudié parmi les qualités sensorielles des viandes.

III.6. Facteurs de variation des qualités sensorielles de la viande

Les différentes composantes des qualités sensorielles présentées ci-dessus doivent être maîtrisées tout au long de la filière la viande. Les leviers d'action, liés à l'animal et à sa conduite, sont déterminants durant sa phase de production. Les qualités sensorielles sont sous le contrôle d'un grand nombre de facteurs, allant du déterminisme génétique à l'alimentation de l'animal, en passant par l'âge, le stress, les conditions d'abattage, les conditions de stockage et de maturation...etc.

III.6.1. Facteurs de production liés à l'animal

III.6.1.1. Age

Il est admis que la tendreté de la viande bovine évolue peu dans le jeune âge et a tendance à diminuer lorsque les animaux atteignent l'âge adulte (Oury *et al.*, 2007 ; Micol *et al.*, 2010). En effet, au cours de la croissance et du vieillissement, la structure et la composition des muscles évoluent, entraînant ainsi des modifications de la tendreté, de la flaveur et de la couleur des viandes. Il a notamment été observé une augmentation de la dureté des viandes principalement en raison d'une diminution de la solubilité du collagène chez des animaux âgés (Gerrard *et al.*, 1987 ; McCormick, 2009). En plus du collagène, d'autres paramètres biologiques joueraient un rôle dans la variabilité de la tendreté liée à l'âge. En effet, avec l'âge, la structure contractile devient moins sensible à l'action des protéases endogènes et des sels (Ouali, 1990). De même, l'augmentation au cours du vieillissement du taux de l'activité oxydative des fibres musculaires et de la teneur en lipides intramusculaires (Jurie *et al.*, 1995) contribuent au développement de la flaveur de la viande. Par exemple, de la naissance jusqu'à l'âge de 12 mois, le jeune bovin mâle présente une diminution de la proportion de fibres de type oxydo-glycolytique IIA, au bénéfice des fibres de type glycolytique IIX favorisant ainsi l'élévation de l'activité glycolytique du muscle (Jurie *et al.*, 1995).

Dès lors, cette évolution se ralentit puis s'inverse progressivement. L'activité oxydative qui se développe entraîne une augmentation de l'adiposité liée au stockage de lipides et d'acides gras au niveau des fibres (Geay et Renand, 1994). Ceci favorise une meilleure saveur mais également une plus forte jutosité. L'intensité de la couleur varie également en fonction de l'âge. En effet, la teneur en myoglobine des muscles s'accroît très rapidement pendant les deux premières années de vie de l'animal à un rythme propre à chaque muscle. Ainsi, la couleur de la viande est d'autant plus claire que les animaux sont abattus jeunes (Renerre, 1982).

III.6.1.2. Sexe

Les caractéristiques musculaires évoluent différemment entre mâle et femelle (Micol *et al.*, 2010). L'effet du sexe a été mis en évidence principalement sur la couleur et la tendreté de la viande. A âge égal, les génisses donnent généralement des viandes plus rouges que les taurillons en raison d'une augmentation des teneurs en myoglobine plus rapide au cours de leur croissance (Monin, 1991). De plus, leurs viandes sont également plus tendres, la teneur en collagène et son insolubilité étant plus élevées chez le taurillon. La taille des fibres musculaires semble aussi jouer un rôle important puisque les taurillons présentent des fibres plus grosses que celles des génisses.

La saveur de la viande est également affectée par le sexe des animaux. L'engraissement des génisses étant plus rapide que celui des jeunes bovins, leurs viandes présentent donc un degré de persillé plus important et sont plus goûteuses. Chez les bœufs, animaux castrés, la proportion de masse grasse étant intermédiaire entre celle des génisses et des taurillons, la saveur de leur viande apparaît supérieure à celle de jeunes bovins mais inférieure à celle des génisses (Geay et Renand, 1994).

III.6.1.3. Race

Les comparaisons entre races sur la tendreté de la viande sont délicates à interpréter (Micol *et al.*, 2010). En effet, chaque génotype a son potentiel de développement musculaire et sa maturité physiologique qui lui sont propres, ce qui amène à comparer des animaux à des stades physiologiques différents. Les animaux issus des races laitières, mixtes ou à viande présentent des caractéristiques musculaires variées en raison principale de différences marquées dans leur physiologie. Ainsi les qualités sensorielles des viandes sont dépendantes de la race de l'animal dont elles sont issues malgré une variabilité individuelle importante au sein de chaque race (Dransfield *et al.*, 2003).

Par exemple, [Monsón et al. \(2005\)](#) ont montré des différences significatives de la tendreté de la viande maturée entre 1 et 7 jours provenant de 4 races : une race laitière (Holstein), une race mixte (Brown Swiss) et deux races à viande (Limousine et Blonde d'Aquitaine). Au début de la maturation, les viandes issues des races allaitantes sont en effet plus tendres que les autres viandes. Toutefois, ces différences s'estompent au cours de la maturation. De même, [Sinclair et al. \(2001\)](#) ont montré que les viandes de bœufs Holstein étaient moins tendres que les viandes de bœufs Charolais ou Angus. Les caractéristiques musculaires propres à chaque race et en particulier la quantité, la solubilité et l'organisation spatiale du collagène, la quantité de gras intramusculaire mais également les activités des enzymes protéolytiques et notamment du système calpaïne/calpastatine, peuvent expliquer les différences de tendreté observées entre les races. L'étude réalisée par [Dransfield et al. \(2003\)](#) visant à comparer deux races rustiques (Aubrac et Salers) et deux races à viandes spécialisées (Charolaise et Limousine) ne montre aucune différence significative entre les qualités sensorielles de leur viande. En revanche, ces animaux diffèrent par leurs caractéristiques musculaires ([Jurie et al., 2005](#)). Des études récentes sur des effectifs plus importants de races ont également mis en évidence des différences dans les qualités sensorielles ([Olleta et al., 2006](#) ; [Christensen et al., 2011](#)).

Par ailleurs, entre types raciaux, la couleur est essentiellement dépendante de la précocité de l'animal, ces différences s'expriment tout particulièrement durant la phase de croissance de l'animal avant l'acquisition de sa maturité d'adulte ([Micol et al., 2010](#)). Les types génétiques anglo-saxons et laitiers, en moyenne plus précoces, se colorent plus intensément et plus vite que les types à viande continentaux. Ainsi, ces différences entre races sont estompées quand elles sont comparées à un même stade physiologique de développement ou de maturité ([Renner, 1982](#)).

III.6.2. Facteurs liés à l'alimentation

L'alimentation des bovins, par le niveau et la nature des apports énergétiques et azotés, induit une variabilité plus ou moins importante des qualités sensorielles des viandes en modifiant les caractéristiques musculaires des animaux à l'abattage ([Geay et al., 2002](#)). L'alimentation permet, en effet, de moduler la vitesse de croissance et le développement des animaux. Ainsi, chez le bovin, par exemple une restriction alimentaire s'accompagne d'un ralentissement de la vitesse de croissance mais également d'une réduction de la proportion de fibres rapides glycolytiques au profit des fibres oxydatives ([Picard et al., 1995](#)).

Cette restriction entraîne une réduction du taux de synthèse et de dégradation des protéines myofibrillaires (Jones *et al.*, 1990), une augmentation de la teneur en collagène et une diminution de sa solubilité (Miller *et al.*, 1987), caractéristiques défavorables à la tendreté de la viande. La flaveur est également détériorée en raison d'une diminution des dépôts adipeux et des lipides intramusculaires. Inversement, lorsque le niveau alimentaire s'accroît, notamment durant les phases de finition, les qualités sensorielles des viandes sont améliorées. La couleur de la viande semble être moins affectée par le niveau de l'alimentation.

En outre, l'alternance, volontaire ou non, de périodes d'apports alimentaires réduits ou élevés, engendre chez les animaux un phénomène de croissance compensatrice, permettant une reprise de la croissance (Hoch *et al.*, 2003). Les conséquences de cette croissance sont variables selon les expérimentations. Allingham *et al.* (1998) ont mis en évidence une amélioration de la tendreté du muscle *Semitendinosus* grâce à une réduction de la dureté pouvant être liée à une néosynthèse de collagène très soluble (Listrat *et al.*, 1998). L'accroissement de la tendreté peut également être expliqué par une augmentation de la proportion de fibres musculaires glycolytiques (Picard *et al.*, 1995). Cassar-Malek *et al.* (2004) montrent des effets modérés de la croissance compensatrice sur les caractéristiques musculaires en faveur d'une amélioration de la tendreté de la viande du fait d'une augmentation de la solubilité du collagène.

La nature de l'alimentation a également une influence sur les caractéristiques musculaires et les propriétés sensorielles des viandes. Cependant, ces effets sont généralement confondus avec des modifications quantitatives du niveau alimentaire ou du système de production associé (activité physique, âge). Une étude réalisée chez des bœufs Charolais de 20 mois a ainsi permis de montrer qu'une alimentation à base d'herbe conférait aux animaux un métabolisme plus oxydatif en comparaison des animaux alimentés à l'auge avec un régime à base d'ensilage de maïs (Jurie *et al.*, 1999). De plus, chez ces animaux, la solubilité du collagène était plus élevée. Il est difficile toutefois d'associer ces effets, pourtant favorables à une meilleure tendreté, à la nature de l'alimentation plutôt qu'à son niveau, et à l'exercice physique difficilement quantifiable induit par les déplacements des animaux à la pâture. Une étude complémentaire réalisée chez des bœufs Charolais de 31 mois a permis de mettre en évidence la complémentarité d'une alimentation à base d'herbe (vs ensilage de maïs) et de l'exercice physique au pâturage sur l'orientation des muscles vers un métabolisme plus oxydatif (Jurie *et al.*, 2006).

1. La réactivité au stress de l'animal dépend :

- de ses caractéristiques génétiques
- des conditions d'élevage

2. La nature et l'intensité des réactions à l'abattage dépendent :

- conditions d'abattage
- de la réactivité de l'animal au stress
- de l'état ponctuel physiologique et émotionnel de l'animal
- du vécu et du patrimoine génétique de l'animal

3. Le stress provoque chez les animaux des réponses comportementales et physiologiques :

- L'effet de ces réponses sur le métabolisme dépend :
- de l'ampleur de ces réponses
 - de la génétique
 - des conditions d'élevage

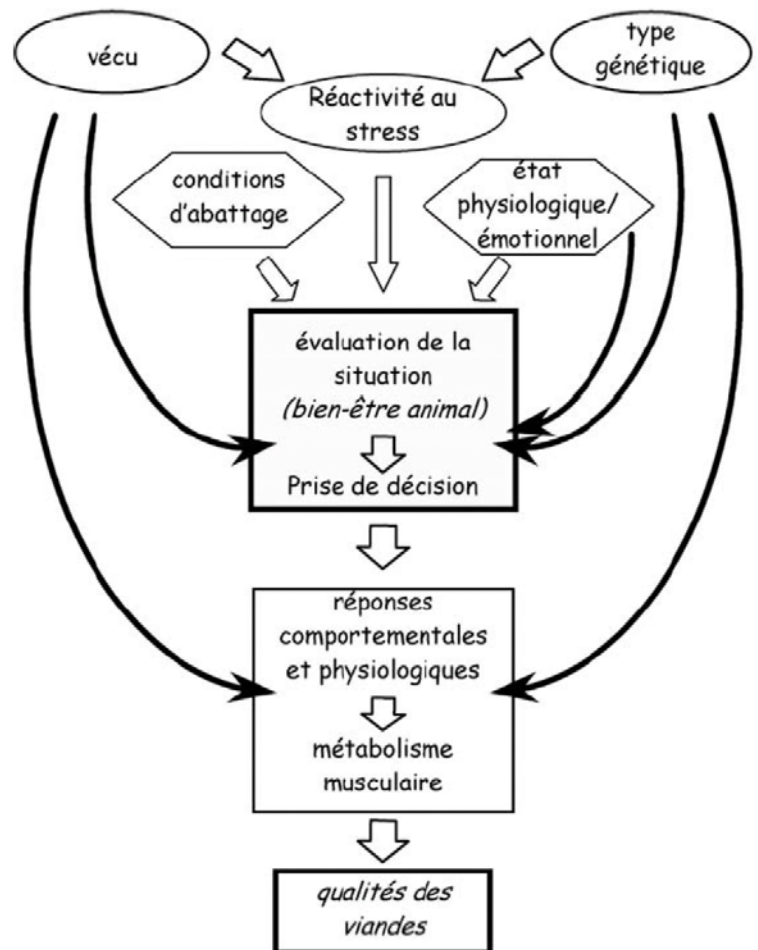


Figure 19. Patrimoine génétique et vécu influencent la résistance au stress : représentation schématique des liens entre la réactivité au stress, le stress à l'abattage et les qualités des viandes (Terlouw, 2005).

Les qualités sensorielles des viandes bovines peuvent aussi être améliorées sous l'effet de suppléments apportés à l'alimentation de l'animal. Certains auteurs ont ainsi montré que l'administration de vitamine D3 induisait une augmentation des concentrations plasmatiques de calcium ayant pour effet d'activer les systèmes protéolytiques *post-mortem* et par conséquent d'améliorer la tendreté de la viande (Swanek *et al.*, 1999; Montgomery *et al.*, 2000). La vitamine E, par ses propriétés antioxydantes, a également des effets bénéfiques sur la couleur et la flaveur des viandes. Une supplémentation en vitamine E permet en effet d'augmenter la concentration en α -tocopherol dans le muscle squelettique et ainsi de réduire l'oxydation des lipides membranaires à l'origine du rancissement de la viande, ainsi que l'oxydation de la myoglobine, responsable du brunissement de la viande (Liu *et al.*, 1995 ; Gobert *et al.*, 2009 ; 2010).

III.6.3. Facteurs technologiques

III.6.3.1. Transport et abattage

Durant tout les processus de pré-abattage et d'abattage, les animaux sont confrontés à de nombreux facteurs d'agression, dont les plus évidents sont le changement de milieu physique et social, la mise à jeun et l'activité physique inhabituelle. Les animaux soumis à des situations aversives, manifestent de multiples réactions physiologiques et métaboliques engendrant un stress (Terlouw et Rybarczyk, 2008 ; Terlouw, 2005 ; 2015). Ces réactions de stress entraînent des modifications du métabolisme musculaire avant et après la mort de l'animal (Figure 19), et par ce biais, ont une influence sur les qualités sensorielles des viandes. Des résultats récents indiquent que le stress avant l'abattage pourrait également influencer la tendreté de la viande (Terlouw *et al.*, 2015). Les différents facteurs de stress peuvent contribuer à l'épuisement précoce des réserves énergétiques musculaires que constitue le glycogène. Ainsi, après abattage, la production d'acide lactique est diminuée. De plus, le pH de la viande reste élevé et les viandes résultantes sont de couleur sombre et présentent une très mauvaise aptitude à la conservation, car elles sont sujettes au développement des flores microbiennes d'altération et des pathogènes. A l'heure actuelle, les liens entre l'évolution du pH et la tendreté pourtant largement étudiés ne sont pas complètement compris, potentiellement parce que les mécanismes sous-jacents varient en fonction de l'état physiologique de l'animal. Une meilleure compréhension des effets du stress à l'abattage sur ces mécanismes permettra une meilleure maîtrise de la tendreté de la viande bovine (Terlouw *et al.*, 2015 ; Terlouw, 2015).

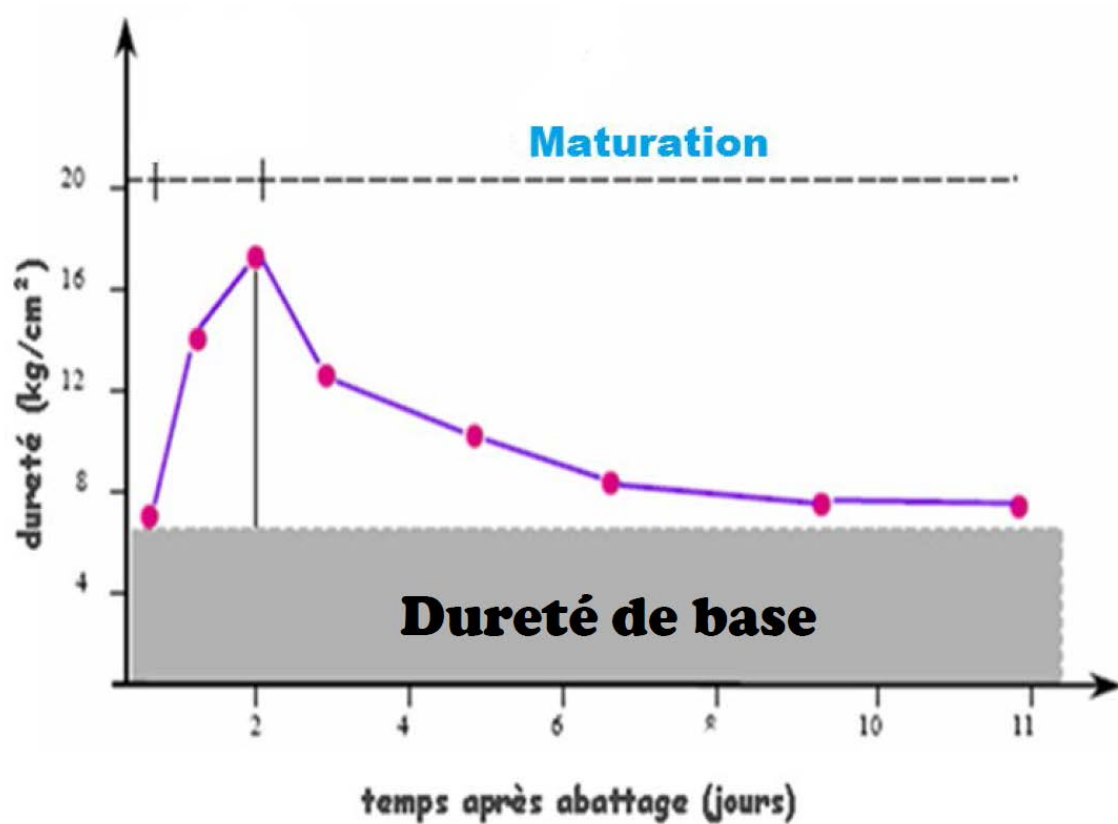


Figure 20. Illustration de l'évolution de la tendreté au cours de la maturation (Ouali, 1991).

III.6.3.2. Conservation et durée de maturation de la viande

La conservation des viandes est également un facteur important pouvant influencer les qualités sensorielles (Ouali, 1991; Culioli, 1998). Pour des raisons d'hygiène et de sécurité alimentaire, les carcasses doivent être conservées à des températures basses de l'ordre de 2°C, et ceci, le plus rapidement possible après la mort de l'animal. Ouali (1991) a montré l'importance de la vitesse de réfrigération des carcasses sur la tendreté de la viande. En effet, une réfrigération trop rapide peut conduire à une dureté excessive de la viande de manière irréversible. Cette altération de la tendreté est liée au phénomène de la contracture au froid (*cold-shortening*), touchant principalement les muscles à contraction rapide, et ne peut être résolue par la maturation, les fibres musculaires étant entrées en rigidité cadavérique à l'état contracté. Toutefois, une réfrigération ultra-rapide peut conduire à des viandes relativement tendres suite à un relargage massif de Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique (Culioli, 1998). Si le Ca^{2+} induit une très forte contraction des muscles, il active cependant et de façon intense les calpaïnes impliquées dans la maturation de la viande conduisant à la dégradation des structures myofibrillaires. Ainsi, les conditions de réfrigération des viandes doivent être maîtrisées afin d'obtenir le moins de variabilité possible de la tendreté.

La maturation de la viande, comme présenté dans le chapitre précédent et illustré dans la Figure 20, constitue aussi un évènement primordial à l'origine de la qualité finale. Différentes études ont ainsi montré qu'une durée de maturation longue était associée à des viandes plus tendres (Morgan *et al.*, 1991). Cependant, la maturation varie fortement entre les animaux et entre les muscles, notamment en fonction de leur composante collagénique et de leur métabolisme. La durée de maturation peut varier de quelques jours à plusieurs semaines. Une maturation (Chapitre II) de la viande bovine durant 14 jours semble toutefois nécessaire pour atteindre une tendreté élevée (Monsón *et al.*, 2005).

III.6.3.3. Cuisson

Lors de la préparation de la viande, le couple temps-température de cuisson est important à prendre en compte. Il influence les différentes composantes sensorielles de la viande et de fait la perception sensorielle de la viande par le consommateur. La cuisson modifie fortement les propriétés mécaniques du muscle et agit directement sur la texture du morceau de viande. Lors de la cuisson dans un four par exemple (Figure 21a), la dureté (évaluée par les forces de cisaillement nécessaires pour rompre l'échantillon) augmenterait lors de deux périodes de cuisson (Figure 21b). Une première augmentation doit se faire lors de la cuisson (à cœur du

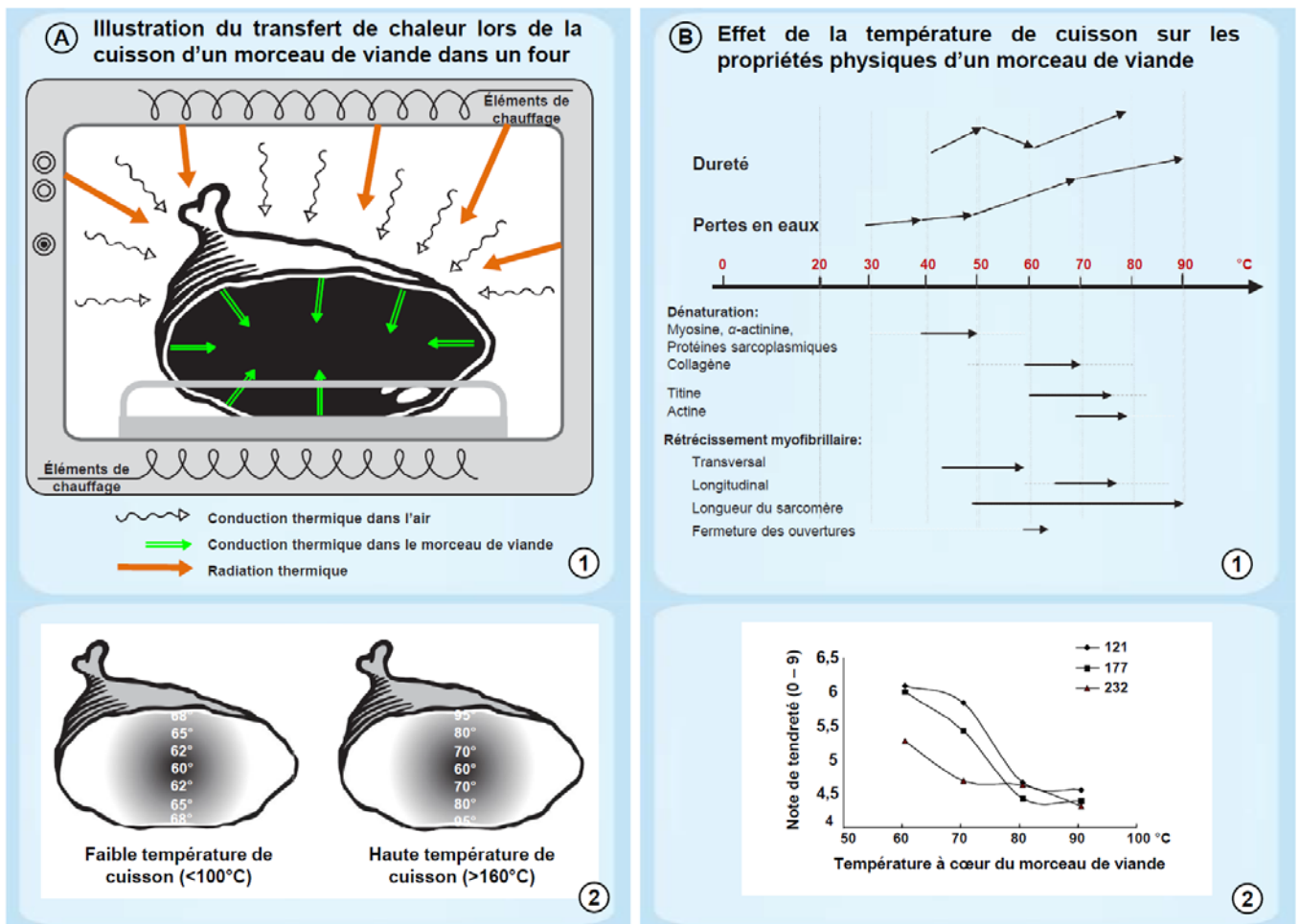


Figure 21. Effet de la température de cuisson sur les propriétés sensorielles de la viande.

A) Illustration du (1) transfert de chaleur dans un morceau de viande cuit dans un four et (2) profil de distribution de la chaleur sur une coupe d'un morceau de viande (à cœur et à la périphérie) en fonction de la température de cuisson (basse $<100^{\circ}\text{C}$ ou haute $>160^{\circ}\text{C}$).

B) Effet de la température de cuisson à cœur du morceau de viande sur (1) la tendreté et les pertes en eau et les protéines impliqués; (2) sur les notes de tendreté du muscle *Longissimus thoracis* du bœuf (échelle 0 – 9)

morceau) entre 40 – 50°C, puis une seconde augmentation se produirait entre 60 et 70°C. Au-delà de 80°C la dureté tendrait à diminuer. Deux composantes vont jouer un rôle sur l'augmentation de la dureté : la composante myofibrillaire et la composante collagénique (McCormick, 2009). La première phase d'augmentation serait due comme illustré dans la Figure 21b à la composante myofibrillaire (dénaturation des protéines myofibrillaires et contraction de l'endomysium). La seconde phase, pendant laquelle l'endomysium sera pratiquement détruit (Li *et al.*, 2010). Elle s'accompagne de la dénaturation thermique du collagène (McCormick, 2009). L'étendu de la contraction varie selon la nature et le nombre de liaisons de réticulation thermostables (Bailey et Light, 1989 ; McCormick, 2009). Le périmysium commence à se désintégrer à 75°C, et au-delà, les fibres de collagène du périmysium apparaissent défragmentées (Li *et al.*, 2010). De plus, les notes de tendreté dépendent de la température de cuisson. Les températures élevées sont plus favorables pour la tendreté à des températures à cœur < 70°C. L'effet de la température de cuisson à cœur est plus important à haute qu'à basse température (Figure 21a, b(2)).

En outre, c'est au cours de l'étape de cuisson que les constituants de la flaveur sont synthétisés. Les conditions de cuisson (en atmosphère sèche ou humide), la température et la durée du traitement thermique s'avèrent donc importants car ils modifient la nature et la concentration des composés volatils à l'origine de la flaveur. Ces paramètres sont également essentiels à la jutosité. La cuisson en milieu sec, pour des morceaux à cuisson rapide, peut conduire non seulement à un durcissement du morceau mais également à son assèchement. Une durée trop longue et une température de cuisson trop élevée peuvent conduire à des viandes peu juteuses (Tornberg, 2005).

En guise de conclusion, la qualité de la viande bovine est le résultat de mécanismes biologiques complexes dont certains de nature physico-chimique et métabolique qui interviennent dans l'élaboration des critères de qualité. Les caractéristiques du muscle et leurs implications dans le déterminisme de la qualité, en particulier celui de la tendreté dépendent du sexe, de l'âge et du type racial des animaux et aussi d'autres facteurs externes liés à sa conduite.

Ma thématique de thèse, ayant pour but de comprendre les mécanismes impliqués et surtout améliorer le pouvoir prédictif de la qualité de la viande bovine par une approche mécanistique, s'appuie sur l'utilisation de protéines biomarqueurs identifiés et validés sur plusieurs races bovines que je décrirai dans le chapitre qui suit.

Chapitre IV

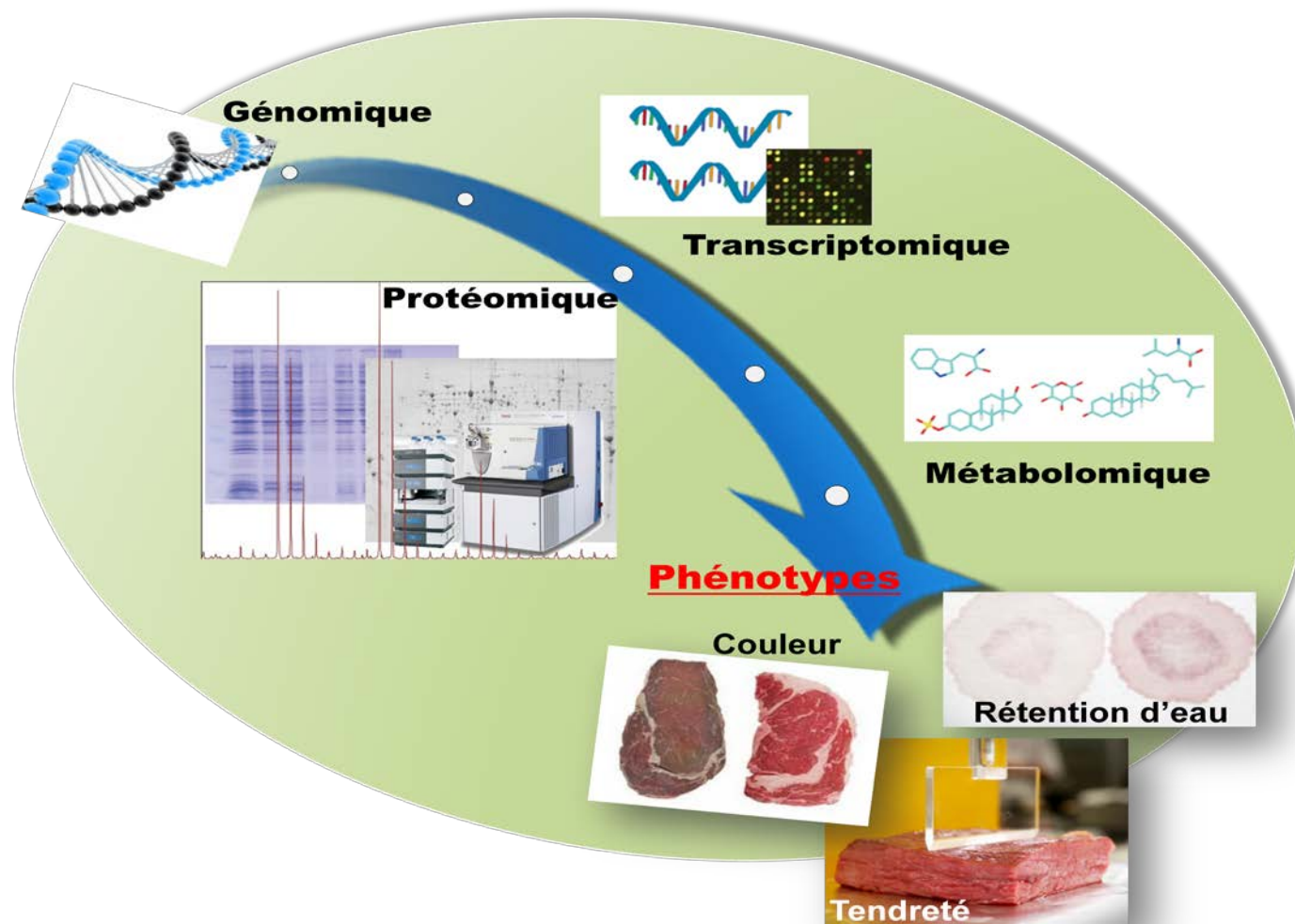


Figure 22. Les techniques « omiques » et la science de la viande.

Représentation schématique des nouvelles techniques de génomique fonctionnelle utilisées pour la quantification de biomarqueurs et la compréhension de la variabilité des différents phénotypes de la qualité de la viande.

Chapitre IV

« Biomarqueurs des qualités des viandes »

Apport de la protéomique, connaissances actuelles et mécanismes impliqués

Depuis une quinzaine d'années, de nouvelles techniques ont été adoptées et utilisées afin de mettre à profit l'analyse de plus en plus complète des génomes et protéomes des animaux d'élevage. En effet, les progrès de la biologie moléculaire autorisent l'analyse de plus en plus exhaustive du polymorphisme et de l'expression des gènes dans le muscle des animaux avant et après abattage (Hocquette *et al.*, 2005 ; Cassar-Malek *et al.*, 2008 ; Almeida *et al.*, 2015). L'utilisation des techniques en -omiques (Figure 22), ont permis une recherche sans *a priori* de biomarqueurs de la tendreté et d'autres paramètres (capacité de rétention d'eau (CRE), couleur, pH, ...etc.) de qualité des viandes sur des centaines, voire des milliers de gènes ou de protéines, et ont ainsi permis d'établir une liste de candidats marqueurs potentiels des qualités recherchées.

IV.1. Définition des biomarqueurs

Un marqueur biologique peut être défini de façon générale comme étant une molécule biologique associée à un phénotype particulier, et qui peut être aisément utilisée afin de caractériser ce dernier (Picard *et al.*, 2011 ; 2015). Les biomarqueurs sont analysés depuis plusieurs années dans de nombreux domaines scientifiques (Hulka, 1990 ; Naylor, 2003). Ils se réfèrent généralement à une mesure qui peut être utilisé comme un indicateur d'un état ou d'une condition biologique.

L'intérêt d'identification de biomarqueurs dans le cas de la viande est de pouvoir les utiliser dans des outils tels que les puces à protéines, employé pour évaluer le potentiel de qualité des animaux et des carcasses. De ce fait, nous avons revisité cette définition, en proposant une nouvelle définition plus large et adaptée et qui est : « Les biomarqueurs de la qualité de la viande, sont des indicateurs des processus biologiques mesurables quantitativement, qui une fois validés peuvent jouer un rôle essentiel dans **i**) la compréhension de la transformation du muscle en viande ; **ii**) les programmes de sélection génétique ; **iii**) la prédiction de l'évolution et la mise en place de la qualité et/ou **iv**) la gestion et la classification des carcasses de viandes » (Picard *et al.*, 2015b ; Gagaoua *et al.*, 2015a).

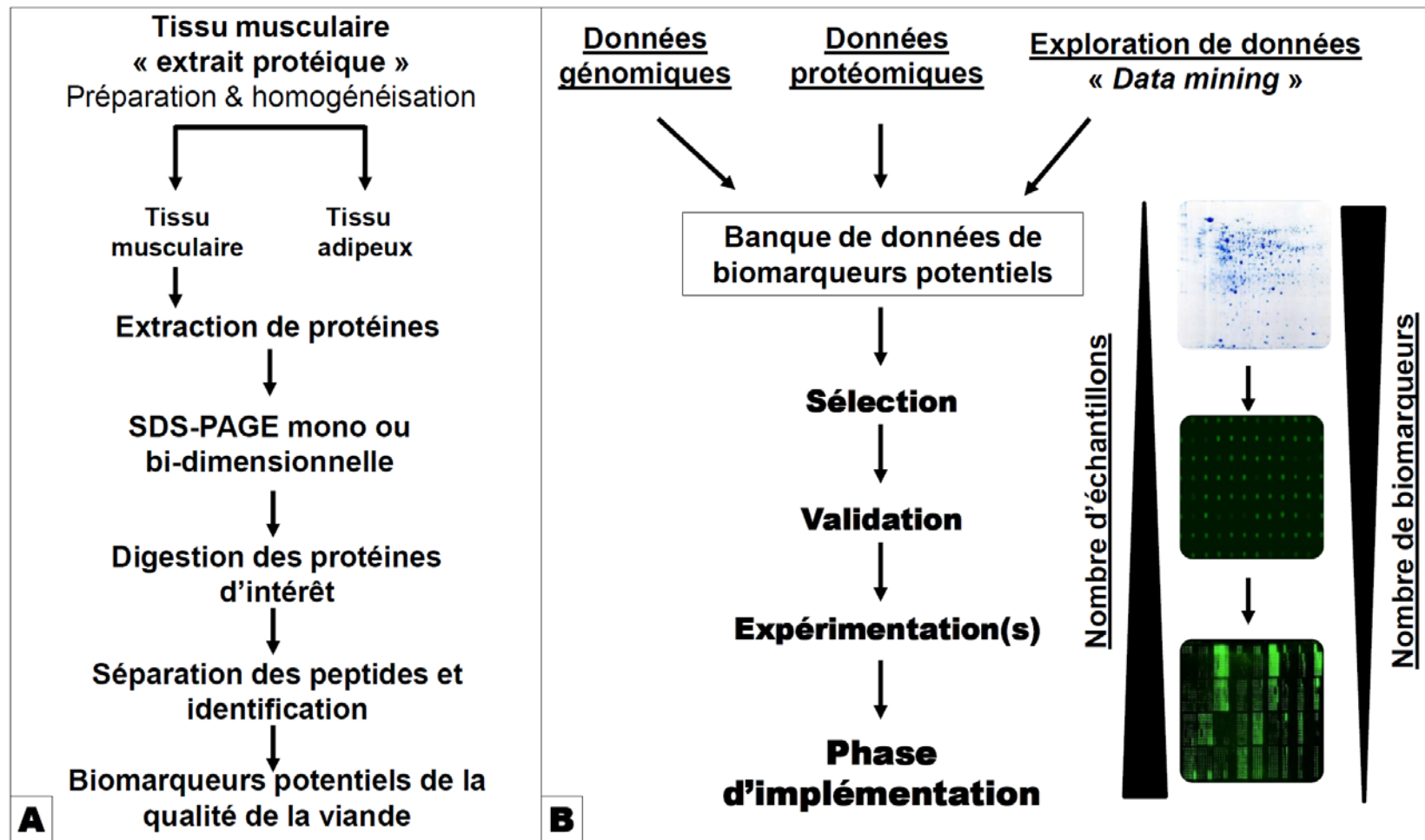


Figure 23. Identification de protéines marqueurs de la qualité de la viande: du laboratoire à la validation et développement pour des mesures de routine.

A) Etapes préparatives et identification des biomarqueurs potentiels par stratégie protéomique et **B)** étapes de validation des biomarqueurs identifiés au laboratoire par la génomique, protéomique ou issus des études *in-silico* et de la littérature.

IV.2. Le « cycle » des biomarqueurs

Les mécanismes biologiques qui régissent les paramètres de qualité des productions animales (élevages) sont complexes et non encore élucidés, ce qui rend difficile la mesure de ces paramètres. Certains d'entre eux ne peuvent être mesurés qu'après la mort de l'animal. Pour cela, les biomarqueurs peuvent jouer un rôle crucial et ont été proposés pour **i)** gérer un groupe d'animaux donnés ; **ii)** expliquer et/ou prédire les paramètres régissant la qualité du produit (viande) et **iii)** contribuer à la sélection génétique.

Pour leur validation et utilisation dans la filière viande et en routine, les biomarqueurs doivent passer par un processus multi-étapes (te Pas *et al.*, 2011) comprenant une phase de préparation, de recherche, de validation et d'implémentation comme décrit ci-après et illustré dans la Figure 23. Le cycle des biomarqueurs comprend différentes phases chacune comprend une ou plusieurs logique(s) d'instruction afin de pouvoir arriver à une mettre en place et d'une manière efficace le ou les biomarqueur(s).

IV.2.1. Phase de préparation : cette phase nécessite de

- 1) décrire en concertation avec l'industriel de la filière viande (élevage ou abattoirs) l'objectif exact de l'utilisation du biomarqueur ;
- 2) chercher les biomarqueurs préexistants ou potentiels issus des investigations préliminaires ;
- 3) développer une recherche scientifique (projet) si l'étape 2 est négative.

IV.2.2. Phase de recherche : la phase de recherche nécessite

- 4) un choix judicieux d'une technologie « -omique » basée sur le biomarqueur recherché et une recherche au niveau génomique. Cette étape a pour but d'élucider le mécanisme impliqué pour paramètre de production en utilisant le ou les biomarqueurs identifiés ; et
- 5) d'utiliser des échantillons biologiques issus d'animaux avec des paramètres de productivité connus. Le type d'échantillon biologique dépend du tissu dans lequel le paramètre est mesuré et le type d'échantillon biologique pour lequel le biomarqueur est destiné ; puis de
- 6) déterminer statistiquement le nombre d'échantillons biologiques nécessaires.

IV.2.3. Phase de validation : l'obtention d'une liste préliminaire de biomarqueurs tests incite la mise en place d'une étape de validation qui a pour but de

- 7) déterminer la fiabilité et robustesse du biomarqueur ; et
- 8) d'effectuer une validation interne et externe. Cette phase nécessite un nouveau lot d'échantillons indépendants des échantillons utilisés précédemment.
- 9) le biomarqueur pourra être utilisé pour prédire le paramètre de production, après quoi la prédiction est comparée avec les paramètres réels mesurés.

IV.2.4. Phase d'implémentation ou de mise en place : durant cette étape 10) le biomarqueur sera intégré dans le processus de production : en ligne ; sur site, ...etc.

Il s'avère de cette chronologie de phases, de la découverte d'un biomarqueur d'un trait de qualité donnée à son évaluation scientifique sont les premières étapes du développement. La place des techniques « -omiques » émergentes font qu'aujourd'hui une liste non exhaustive de biomarqueurs des qualités des viandes est disponible (Figure 29 et Tableau 03). Les techniques « -omiques » notamment la protéomique, ont considérablement contribué à révéler de nombreux mécanismes bien jusqu'alors méconnus. La mise en place des technologies protéomiques pour comprendre le protéome du muscle *post-mortem* (voir *ante-mortem*) d'une part, et identifier des biomarqueurs des qualités de viandes d'autre part, sera détaillée dans les parties qui suivent, mais avant une introduction et présentation de l'analyse protéomique sera donnée.

IV.3. La stratégie protéomique

IV.3.1. Définitions du protéome et de la protéomique

C'est un étudiant australien nommé Mark Wilkins ([Wilkins et al., 1996](#)) qui employa le terme protéome pour la première fois lors de ses travaux de thèse. Ce terme, qui résulte de la contraction des mots « protéine » et « génome », représente l'ensemble des protéines exprimées par un génome donné (d'une cellule, un tissu ou un organisme), dans un environnement donné, à un moment donné. A l'inverse du génome, le protéome décrit de façon dynamique les protéines exprimées selon l'état de la cellule. Par contre, les différentes modifications post-traductionnelles rendent l'identification et la compréhension de leur fonction bien plus complexe que l'étude du génome.

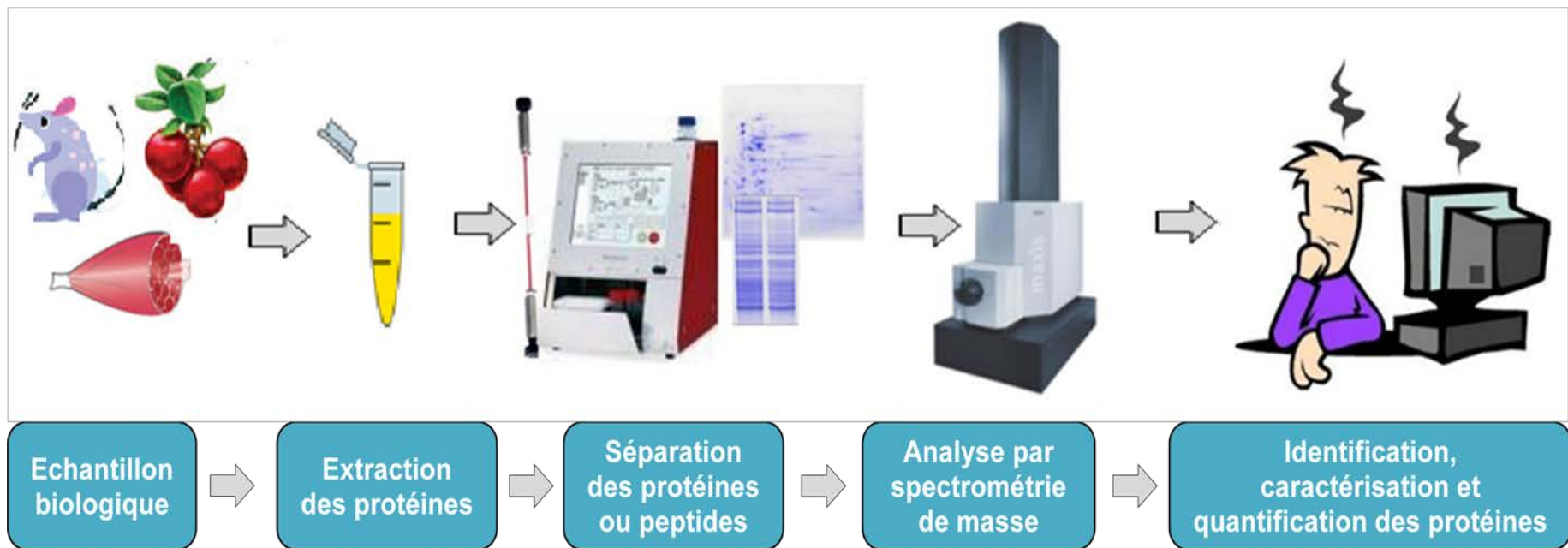


Figure 24. Principales étapes de l'analyse protéomique : de l'échantillon biologique aux protéines identifiées.

Schématiquement l'analyse protéomique commence par l'extraction et fractionnement des protéines d'un échantillon biologique, suivi d'une séparation par électrophorèse sur gel mono- ou bidimensionnel et révélation (coloration) des protéines séparées puis récupération des bandes ou spots d'intérêts et leur identification par spectrométrie de masse après une digestion trypsique. Les peptides ainsi obtenus serviront à l'identification, à la caractérisation et/ou à la quantification des protéines à l'aide d'outils bioinformatiques (étude *in silico*).

Le terme analyse protéomique introduit en 1998 désigne « l'analyse quantitative des niveaux d'expression des protéines permettant la compréhension des mécanismes de contrôle de l'expression génétique » (Anderson et Anderson, 1998). La technique en elle-même consiste à analyser l'ensemble des protéines (protéome) exprimées dans une cellule à un moment donné et dans une situation donnée.

Toutefois, la définition revisitée de Tyers et Mann définit l'analyse protéomique comme étant « l'analyse globale des protéines caractérisées par leurs interactions, leurs modifications et les différents isoformes exprimées dans la cellule » (Tyers et Mann, 2003).

IV.3.2. Stratégies d'identification des protéines

Globalement, deux stratégies permettent l'identification des protéines: l'approche *bottom-up* et l'approche *top-down*. L'approche *bottom-up* qui a longtemps été la plus utilisée repose sur une stratégie basée sur la digestion protéolytique des protéines d'intérêt suivie d'une identification par spectrométrie de masse. L'approche *top-down* qui nécessite l'utilisation de spectromètres de masse permettant une analyse de masse précise repose sur la fragmentation directe des protéines d'intérêt sans digestion au préalable (Zhang *et al.*, 2013 ; Garcia, 2010 ; Catherman *et al.*, 2014)

Aujourd'hui, c'est l'usage de la spectrométrie de masse (MS) qui est plébiscité pour l'analyse du protéome en raison des multiples avancées techniques apparues ces 20 dernières années (Nilsson *et al.*, 2010). La protéomique permet au final non seulement d'inventorier et cartographier (Bouley *et al.*, 2004) les protéines qui composent un protéome donné, mais aussi de déterminer les différences qualitatives et quantitatives induites par une situation physiologique particulière (analyse protéomique différentielle) (Aebersold et Mann, 2003).

L'analyse protéomique est généralement composée d'une série d'étapes (Figure 24). Les protéines sont extraites à partir d'un échantillon biologique et sont ensuite séparées ou fractionnées avant et/ou après digestion enzymatique. Les peptides ainsi obtenus sont analysés par spectrométrie de masse et les spectres générés serviront à l'identification, à la caractérisation et/ou à la quantification des protéines à l'aide d'outils bioinformatiques.

Les techniques de séparation des protéines peuvent être classées en deux grandes catégories : Les techniques de séparation sur gels d'électrophorèse et les techniques de séparation sans gel souvent appelées « Gel-free » ou « OFF-GEL ». Dans ce qui suit, une brève description des techniques séparatives mono- et bidimensionnelle sur gel.

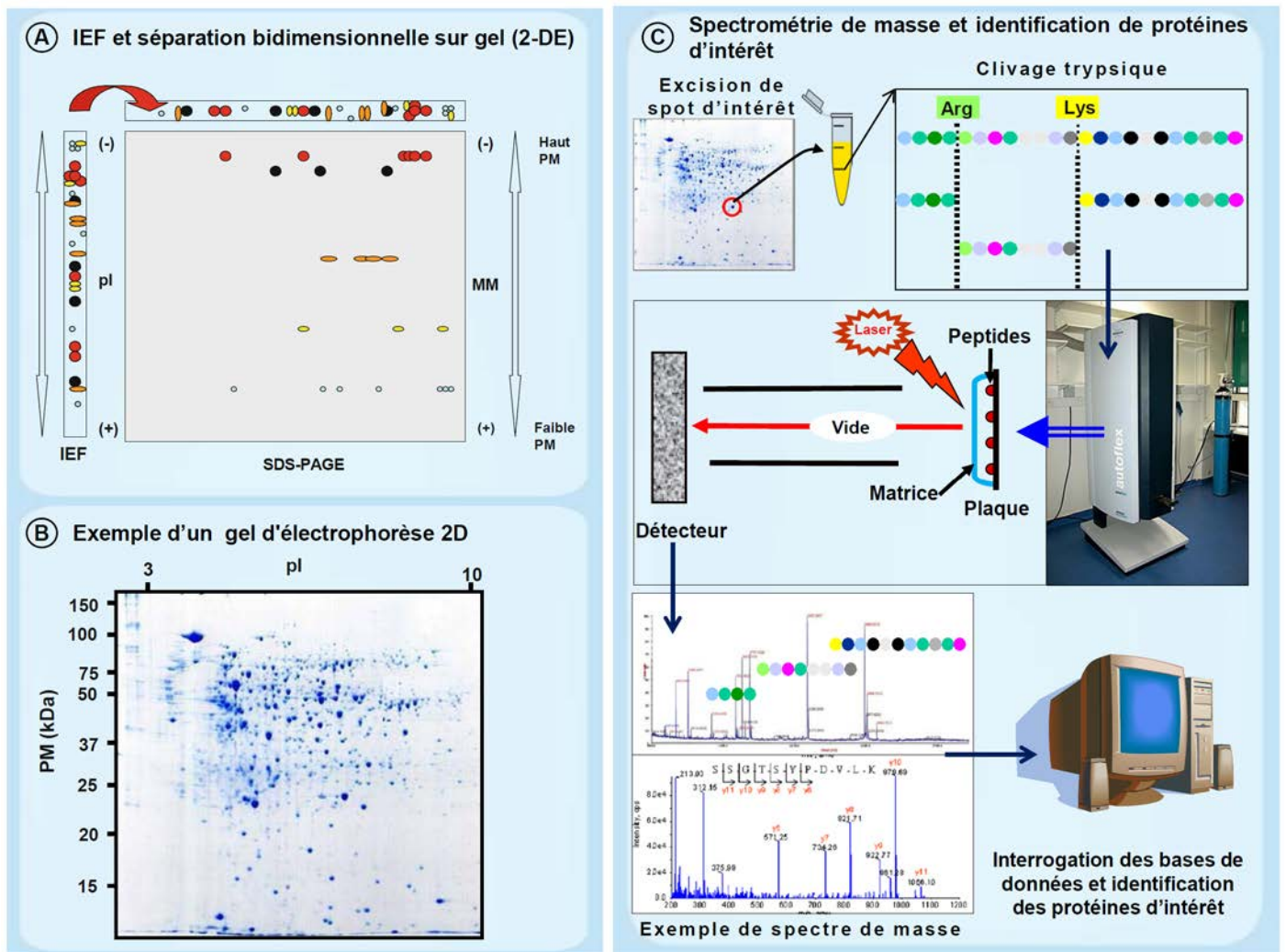


Figure 25. Principe général de l'électrophorèse bidimensionnelle (2DE) et stratégie protéomique.

Les protéines sont séparées dans une (A) première étape en fonction de leur pI après une isoélectrofocalisation (IEF) dans un gradient de pH créée grâce à des copolymères d'acrylamide : les immobilines portant des charges généralement de 3 à 10, mais variables (gradient large, ou étroit ou très étroit). Dans une seconde étape, les protéines de ce gel sont séparées dans un gel SDS-PAGE standard en fonction de leur poids moléculaire puis colorées, (B) par exemple au bleu de Coomassie. Les protéines d'intérêt (spots ou bandes) sont (C) excisées du gel pour une identification poussée par spectrométrie de masse et analyse *in silico*.

IV.3.2.1. Électrophorèse monodimensionnelle (1DE)

L'électrophorèse 1DE en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) ([Laemmli, 1970](#)) est une technique séparative permettant de fractionner le contenu protéique d'un extrait sur un gel d'acrylamide selon la masse moléculaire des protéines. Après extraction, les protéines sont solubilisées dans un tampon contenant le SDS. Ce dernier est un détergent puissant, permettant la solubilisation des protéines en leur conférant une seule charge négative.

Sous l'effet d'un champ électrique, les protéines, qui portent toutes une charge équivalente après traitement au SDS, migrent dans le gel réticulé en direction de l'anode et sont ainsi séparées selon leur masse moléculaire dans les mailles du gel d'acrylamide. Les protéines sont ensuite communément révélées au bleu de Coomassie ou au nitrate d'argent ([Neuhoff et al., 1988](#) ; [Brunelle et Green, 2014](#) ; [Kavran et Leahy, 2014](#)).

Selon le niveau de fractionnement souhaité, on pourra limiter la séparation à l'obtention d'une seule bande regroupant toutes les protéines (le gel « stacking ») ou au contraire l'étendre jusqu'à obtention d'une multitude de bandes correspondant aux protéines de l'échantillon selon l'objectif escompté. Il est aussi possible de faire varier la réticulation du gel (la taille des mailles) afin d'augmenter la capacité résolutive sur des gammes de masses moléculaires spécifiques.

IV.3.2.2. Électrophorèse bidimensionnelle (2DE)

L'électrophorèse bidimensionnelle (2DE) ([O'Farrell, 1975](#)) comme présentée ci-dessus, consiste à séparer les protéines sur deux dimensions. Dans une première dimension, les protéines sont séparées selon leur point isoélectrique (pI) dans une bande de gel d'acrylamide fonctionnalisée avec des immobilines ou IPG-Strip (acides et bases faibles créant un gradient de pH) par isoélectrofocalisation (IEF) ([Gorg et al., 2004](#)). Dans une seconde dimension, les protéines sont séparées sous l'effet d'un champ électrique, selon le même procédé que le gel SDS-PAGE, au sein d'un gel d'acrylamide (environ 20 x 20 cm le plus souvent) plus ou moins réticulé (rapport acrylamide/bis acrylamide) selon leur masse moléculaire. Le principe général de l'électrophorèse 2DE est présenté en Figure 25.

L'électrophorèse bidimensionnelle permet donc la séparation en routine de 2000 protéines environ. Elle offre également l'avantage d'être compatible avec la spectrométrie de masse, de permettre l'observation de la présence de certaines modifications post-traductionnelles (MPT) et de conserver des informations relatives aux propriétés physico-chimiques des protéines comme leur poids moléculaire ou la valeur de leur point isoélectrique (Rabilloud *et al.*, 2010). La révélation des spots protéiques sur les gels 2D offre l'avantage de permettre la quantification de l'abondance relative des protéines contenues dans divers échantillons.

Pour la visualisation des protéines séparées sur les gels 1DE ou 2DE, il existe de nombreux types de révélations qui diffèrent par leur sensibilité et gamme de linéarité de réponse :

- Ξ la coloration au bleu de Coomassie (sensibilité 50 – 100 ng environ, linéarité : 2 – 3 ordres de grandeur) (Westermeier et Marouga, 2005) ;
- Ξ au nitrate d'argent (sensibilité de l'ordre du ng ; gamme de linéarité < 2 ordres de grandeur) (Rabilloud, 1999) ;
- Ξ le marquage des protéines avec des composés fluorophores (sensibilité < 0,1 ng ; gamme de linéarité : 4 – 5 ordres de grandeur) (Marouga *et al.*, 2005). Les colorations fluorescentes qui permettent d'atteindre des sensibilités de l'ordre de l'attomole, sont souvent utilisées dans le cas de la DiGE citée ci-dessus.

IV.3.2.3. Analyse des peptides par spectrométrie de masse et PMF

Un spectromètre de masse permet la mesure du rapport masse sur charge (m/z) des peptides issus de la digestion enzymatique des protéines de l'échantillon à analyser, ainsi que de leurs fragments qui sont générés au sein des instruments. Les spectromètres de masse combinent 4 éléments : la *source*, qui permet l'ionisation et la volatilisation des molécules, une *interface* qui permet la transmission et la focalisation des ions vers l'analyseur, un *analyseur* qui « filtre » (sépare) les ions selon leur rapport m/z et un *détecteur* contre lequel les ions viennent frapper permettant la détection du signal.

Les sources qui permettent d'ioniser les protéines sont dites « douces » puisque l'énergie qu'elles leur transmettent ne risque pas de les détruire. Il s'agit des sources MALDI (*Matrix-Assisted Laser Désorption/Ionisation*) (Karas et Hillenkamp, 1988) et électrospray (Fenn *et al.*, 1988). La source électrospray par exemple permet l'ionisation de molécules en solution à pression atmosphérique sous l'effet d'un champ électrique.

Tableau 02. Revue non-exhaustive des approches de protéomique quantitatives les plus utilisées dans le domaine des sciences de la viande.

Approche	Méthode	Exemples	Objectif	Références
Gel-based	Comparaison de l'abondance de protéines	SDS-PAGE (1-D)	Changement du profil protéique lors de l'attendrissage du muscle <i>Longissimus</i> bovin Différences chez des poulets sélectionnés pour leur poids/rendement en carcasses Utilisation de bandes protéiques pour prédire la tendreté de la viande bovine Analyse de protéines associées à la masse corporelle et conformation de la perchaude Analyse protéomique du muscle de la morue atlantique, <i>Gadus morhua</i>	(Sawdy <i>et al.</i> , 2004) (Updike <i>et al.</i> , 2005) (Zapata <i>et al.</i> , 2009) (Reddish <i>et al.</i> , 2008) (Gebriel <i>et al.</i> , 2010)
		DIGE	Changement dans les fibres légères de myosines au cours de stockage du muscle <i>LT</i> bovin Biomarqueurs de la tendreté de la viande bovine dans le muscle <i>Longissimus</i> Comparaison des profils protéomiques de deux races porcines à différents âges Effet de la température de stockage sur la dégradation du muscle du bar commun Analyse de l'exsudat de la viande porcine fraîche en réponse au stress	(Muroya <i>et al.</i> , 2007) (Jia <i>et al.</i> , 2009) (Hollung <i>et al.</i> , 2009) (Terova <i>et al.</i> , 2011) (Di Luca <i>et al.</i> , 2013)
Label-based	Coloration par isotopes chimiques	iTRAQ	Abondances protéiques dans le muscle <i>Longissimus</i> : viande tendre vs. dure Impact de la restriction alimentaire sur le protéome du mouton australien <i>Peppin</i>	(Bjarnadottir <i>et al.</i> , 2012) (Almeida <i>et al.</i> , 2014)
Label-free	Intensité du signal des spectres de masse des peptides détectés	SELDI-TOF	Dégradation du protéome du muscle <i>Longissimus</i> porcin et impact sur la qualité Biomarqueurs de la qualité de la viande porcine dans le muscle <i>Longissimus</i> Comparaison du profil protéomique de deux muscles de cinq races porcines pures Biomarqueurs de la viande porcine du muscle <i>Longissimus</i> chez quatre races	(Te Pas <i>et al.</i> , 2009) (Te Pas <i>et al.</i> , 2013) (Mach <i>et al.</i> , 2010) (Marcos <i>et al.</i> , 2013)
		MALDI-TOF	Modification du protéome du muscle <i>LT</i> et relation avec la qualité de la viande porcine	(Lametsch <i>et al.</i> , 2003)
		LC-ESI-MS	Identification de protéines spécifiques d'oxydation dans le muscle du poulet	(Stagsted <i>et al.</i> , 2004)
		LC-MS/MS	Impact du stockage et conditions pré-abattage sur le protéome de la viande du porc Modification du protéome du muscle <i>Pectoralis</i> du poulet au cours de la croissance Analyse protéomique de l'hypertrophie du muscle bovin des taurillons bleu belge Protéolyse et relation avec la qualité de la viande du muscle <i>Longissimus</i> porcin	(Morzel <i>et al.</i> , 2004) (Doherty <i>et al.</i> , 2004) (Bouley <i>et al.</i> , 2005) (Hwang <i>et al.</i> , 2005) (Bauchart <i>et al.</i> , 2006)
		XIC-based nLC-MS/MS	Peptides de faible PM libérés au cours du stockage et la cuisson de la viande bovine Une méthode pour la quantification des protéines d'un extrait de viande de porc	(Gallego <i>et al.</i> , 2015)
		LESA-MS	Détection rapide de biomarqueurs de stabilité chez le bovin, porcin, équin et volaille Identification des protéines musculaires de mélanges de bovin, équin, porcin et volaille	(Montowska <i>et al.</i> , 2014a) (Montowska <i>et al.</i> , 2014b)

Abbreviations: **DIGE:** Difference Gel Electrophoresis; **iTRAQ:** isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification; **SELDI-TOF:** Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization-time-of-flight; **MALDI-TOF:** Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-time-of-flight; **XIC:** Extracted Ion Currents; **nLC-MS/MS:** nanoliquid chromatography-tandem mass spectrometry; **LESA-MS:** Liquid Extraction Surface Analysis Mass Spectrometry

Il existe différentes géométries d'analyseurs qui peuvent être caractérisées par la gamme de masses analysables, leur précision de masse, leur sensibilité et leur résolution. Le choix de l'analyseur doit donc être adapté à chaque type d'analyse, qu'elle soit qualitative ou quantitative. Les analyseurs les plus utilisés sont : **i)** l'analyseur quadripolaire (Q) ; **ii)** le piège à ions quadripolaire (IT) ; **iii)** l'analyseur en temps de vol (TOF) et **iv)** l'analyseur à transformée de Fourier (FT-ICR).

L'apparition des banques de données protéiques et leur enrichissement en séquences protéiques ainsi que les développements instrumentaux récents ont conduit à l'apparition de différentes stratégies pour l'identification des protéines. Ainsi, le concept de l'identification par empreinte peptidique massique PMF (« *Peptide Mass Fingerprint* ») a été décrit (Pappin *et al.*, 1993 ; Henzel *et al.*, 2003 ; Thiede *et al.*, 2005). Cette stratégie consiste à identifier les protéines en comparant la liste des masses expérimentales des peptides à l'ensemble des listes de masses calculées à partir des séquences des peptides issues de la digestion *in silico*.

De nombreux moteurs de recherche PMF sont développés. On peut citer entre autres Mascot (Cox *et al.*, 2014), MOWSE (Hsu *et al.*, 2003), MS-Fit (Sandin *et al.*, 2014), ProFound (Cappadona *et al.*, 2012), etc. En général, cette stratégie est utilisée pour identifier des protéines séparées par gel 2DE puis digérées et analysées par MALDI-TOF-MS. En effet, avec la croissance considérable du nombre d'entrées dans les banques de séquences protéiques, la spécificité du PMF est devenue très limitée (Venable *et al.*, 2004) par rapport au séquençage par MS/MS des peptides.

IV.4. L'analyse protéomique pour la découverte de biomarqueurs

En raison de l'abondance et de la diversité des protéines et la grande quantité de l'information générée, la production, le traitement et l'interprétation des données protéomiques est une tâche très complexe. Des échantillons de tissus de mammifères contiennent entre 10 000 et 30 000 types de protéines différentes, d'où une large gamme de technologies (Tableau 02) qui doit être utilisé en parallèle pour préparer, séparer et quantifier les abondances des milliers de protéines (Mullen *et al.*, 2009 ; Bendixen, 2005 ; 2013). Une liste non exhaustive des approches protéomiques appliquées dans le domaine des viandes à la recherche d'indicateurs de qualité est présentée dans le Tableau 02.

Initialement, l'électrophorèse, monodimensionnelle (Laemmli, 1976) puis bidimensionnelle (2DE) après coloration simple au Bleu de Coomassie ou au nitrate d'argent

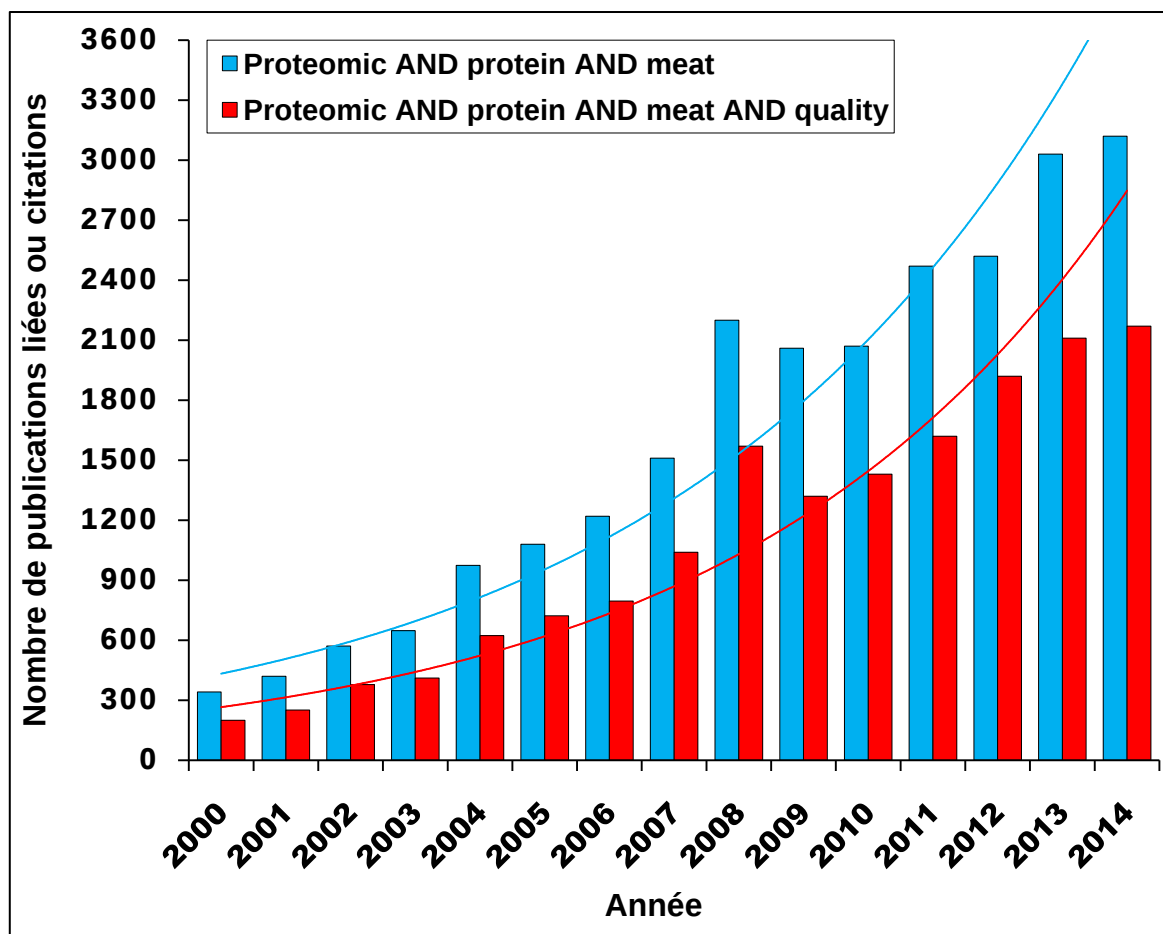


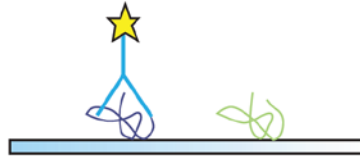
Figure 26. Evolution de l'utilisation de la protéomique.

Histogrammes montrant l'évolution du nombre de travaux scientifiques publiés durant la période 2000 – 2014 et liés à l'application de la protéomique dans le domaine des viandes. Le graph a été préparé en interrogeant le moteur de recherche bibliographique « *Google Scholar* ». La requête a été effectuée le 15.04.2015 en utilisant comme mots clés « *Proteomic* » ; « *Protein* » ; « *Meat* » et « *Quality* ».

a été utilisée dans l'étude du protéome. La 2DE fait intervenir deux paramètres de séparation, le point isoélectrique (pI) et la masse moléculaire (O'Farrell, 1975 ; Jensen *et al.*, 1998). La séparation permet l'amélioration de la résolution du fractionnement des mélanges de protéines complexes, et permet ainsi aux différentes protéines d'être séparées. La DiGE pour *Difference Gel Electrophoresis*, a été mise au point pour palier aux inconvénients liés aux répliquats techniques de la comparaison de gels 2DE, une technique assez proche mais utilisant des fluorochromes, les cyanines (Unlu *et al.*, 1997 ; Viswanathan *et al.*, 2006). Deux ou trois échantillons de protéines différents sont marqués avec des colorants fluorescents avant la séparation. Ceci permet une analyse plus précise et poussée des différences dans l'abondance des protéines entre échantillons.

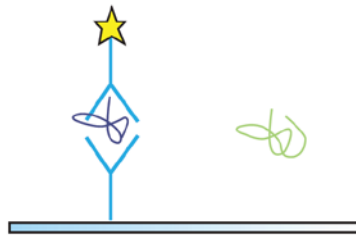
Bien que très utilisée, l'analyse 2DE présente quelques limites pour lesquelles l'opérateur doit rester prudent, par exemple, la co-migration des protéines et la mauvaise résolution et séparation des protéines basiques et hydrophobes. De plus, les protéines faiblement concentrées sont difficiles à étudier et ne sont souvent pas révélées par les colorations classiques (Gygi *et al.*, 2000). Un autre inconvénient de l'analyse 2DE est que lorsqu'elle est appliquée à des échantillons complexes non fractionnés, la surface limitée du gel ne permet d'analyser que les protéines les plus abondantes (Pedersen *et al.*, 2003). De ce fait, le pré-fractionnement d'échantillons complexes peut être appliqué pour contourner ce problème (Gorg *et al.*, 2002; Spandidos et Rabbitts, 2002).

La caractérisation et l'identification des spots d'intérêt font aussi appel à d'autres techniques d'identification, appelées communément la spectrométrie de masse (MS) (Malmstrom *et al.*, 2007). Deux principales applications de la MS ont vu le jour dans les études protéomiques. La première est l'identification des spots de protéines à partir d'un gel 2DE ou directement des extraits protéiques et la deuxième est la protéomique comparative. Les technologies de MS les plus utilisées pour l'identification des protéines sont l'ionisation électrospray (ESI) (Fenn *et al.*, 1989) et le MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*) (Hillenkamp *et al.*, 1991). Le MALDI peut être combiné avec un analyseur de masse en temps de vol (TOF pour *time-of-flight*). Cette technologie est idéale pour analyser les empreintes peptidiques massiques (PMF), de protéines digérées par protéolyse, par exemple, digestion trypsique. Les spectres des peptides ne sont pas quantitatifs, mais qualitatifs, vu que les capacités d'ionisation des peptides ne sont pas visualisables (Lim *et al.*, 2003). Une analyse *in silico*, par comparaison aux bases de données d'empreinte peptidiques est effectuée.



(a) biopuce à protéine basée sur l'analyse d'interactions antigène-anticorps.

Les antigènes sont déposés sur des lames de verre. Les anticorps qui sont marqués se lient à des antigènes et émettent le signal fluorescent. A l'inverse les anticorps peuvent être fixés sur le support et l'antigène marqué venir interagir avec ces derniers



(b) détection basée sur le principe immunologique en sandwich.

Les anticorps sont déposés sur les puces et le lysat cellulaire est appliqué à la lame. Un second anticorps marqué va révéler l'interaction du premier anticorps avec la protéine d'intérêt



(c) détection directe de l'interaction protéine-protéine.

Des protéines sont déposées sur une puce et des protéines marquées sont incubées sur cette dernière, déterminant ainsi où peuvent se lier et interagir les protéines marquées

Figure 27. Principe des biopuces à protéines ([Anton Leberre, 2013](#)).

La molécule-partenaire est marquée à l'aide d'un fluorophore. Une fois les molécules mises en contact avec la biopuce, les complexes formés émettront une fluorescence détectable. La lecture des spots sera alors réalisée par un scanner et analysée par un logiciel qui va traduire ces signaux en informations représentatives de l'abondance relative des protéines. Les fluorophores les plus utilisés sont des dérivés de la cyanine solubles dans l'eau qui émettent à des longueurs d'onde comprises entre 500 et 650 nm. Une seconde approche, connue sous le terme de « sandwich », présente l'avantage de ne pas perturber la structure de la molécule-partenaire et augmente de ce fait l'intensité du signal. Dans ce cas, l'interaction entre les molécules partenaires est détectée par un anticorps marqué.

Comme alternative, de nouvelles autres technologies se caractérisant par une vitesse et sensibilité très élevées ont été proposées et appliquées pour remédier aux défauts de la 2DE seule. Nous citons le SELDI-TOF (*Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization-time-of-flight*) (Marcos *et al.*, 2013a,b) ; XIC-based (*Extracted Ion Currents*) (Bauchart *et al.*, 2006) ; nLC-MS/MS (*nanoliquid chromatography-tandem mass spectrometry*) (Gallego *et al.*, 2015) ; LESA-MS (*Liquid Extraction Surface Analysis Mass Spectrometry*) (Montowska *et al.*, 2014a,b) et iTRAQ (*isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification*) (Ross *et al.*, 2004 ; Ernoult *et al.*, 2008). Pour la majorité de ces techniques, la quantification est très spécifique avec une très haute répétabilité. En outre, le fractionnement par la méthode OFF-GEL est une autre alternative qui séduit un bon nombre de laboratoires. Elle est de plus en plus appliquée dans le domaine des viandes (Sentandreu *et al.*, 2010 ; Surowiec *et al.*, 2011 ; Fernandez *et al.*, 2015). Cette méthode est basée sur une séparation de molécules amphotères, en fonction de leur pI, dans un gradient de pH soumis à un champ électrique (Ros *et al.*, 2002). L'évolution de ces technologies protéomiques ainsi que leurs applications dans les sciences de la viande ne cessent de croître. La Figure 26, en interrogeant le moteur de recherche *Google Scholar* illustre cette évolution croissante depuis le début de l'année 2000.

Enfin, certains laboratoires s'intéressent aujourd'hui aux puces à protéines (biopuces), qui sont des technologies extrêmement sensibles pour l'analyse du protéome. Les biopuces sont des systèmes miniaturisés permettant des analyses sur un grand nombre d'échantillon et à haut débit (Figure 27). Les biopuces sont très utiles dans l'étude des interactions entre biomolécules et les réflexions pour leur utilisation dans le domaine de la viande est d'actualité

Cette technologie, qui est en pleine émergence, offre l'avantage de pouvoir comparer et caractériser simultanément un grand nombre de cibles protéiques (Sakanyan, 2004). Elles impliquent l'utilisation d'une sonde qui est spécifique pour un analyte particulier, placé à la surface de la puce à une position définie. Les principes de base ont été largement documentés par Elkins *et al.* (1989) et illustrés dans la Figure 27. Toutefois, l'application de puces à protéines pour la protéomique n'est pas très avancée par rapport à celle des puces à ADN. Bien que très efficace, cette technologie a des limites. En particulier, les protéines sous-exprimées peuvent ne pas être révélées. D'autre part, des changements affectant les niveaux d'abondances relatives des protéines peuvent impliquer des peptides à faible abondance (Celis *et al.*, 2000). Par conséquent, la technologie des biopuces peut être avantageuse dans ce cas. La finalité de nos recherches actuelles sur l'indentification des biomarqueurs des qualités de viandes est la mise en place d'une biopuce à protéines pour des analyses en routine.

IV.5. Applications des technologies de la protéomique à l'étude du protéome de la viande

Face aux demandes récurrentes et croissantes de la filière viande, les industriels ont changé leur méthodes de production et modernisé les pratiques d'élevages, induisant des modifications au niveau génétique et adaptabilité des animaux, tout en améliorant les potentiels des races, ce qui n'est pas sans effets sur les qualités des produits obtenus ([Paredi et al., 2012](#)). Par conséquent, la prédiction de la qualité des produits devient une nécessité absolue pour la filière viande.

En outre, les méthodes d'évaluation de la texture (qu'elles soient sensorielles ou instrumentales) de la viande sont jugées destructrices, lourdes à mettre en place et dans certains cas, elles ne sont pas souvent adaptées et applicables qu'après abattage. Aussi, il est aujourd'hui nécessaire de trouver une alternative et de développer des outils rapides ne demandant pas de grandes quantités d'échantillons pour pouvoir classer et prédire le potentiel de qualité des animaux.

L'analyse protéomique s'est avérée une solution très efficace pour répondre à cette problématique et démontrer en quoi l'étude globale ou partielle du protéome permet de proposer des mécanismes explicatifs sur l'origine de la variabilité des qualités de la viande, indépendamment de l'espèce bouchère considérée.

Ceci est d'autant plus justifié par l'engouement des scientifiques des sciences animales, en particulier de la viande à l'appliquer dans une vaste gamme de domaines de la recherche en science des viandes ([Bendixen, 2005](#) ; [Lippolis et Reinhardt, 2008](#) ; [Picard et al., 2010](#) ; [Bogges et al., 2013](#) ; [Almeida et al., 2015](#)) tels que la croissance et le développement chez le porc ([Lametsch et al., 2006](#)), le bovin ([Bouley et al., 2005](#)), la volaille ([Doherty et al., 2004](#) ; [Teltathum et Mekchay, 2009](#)), le poisson ([Reddish et al., 2008](#)) et le cheval ([Chernukha et Manyukhin, 2015](#)), le métabolisme *post-mortem* ([Jia et al., 2006a,b](#)), la tendreté et le phénomène d'attendrissage ([Sawdy et al., 2004](#) ; [Zapata et al., 2009](#)), la capacité de rétention d'eau ([Updike et al., 2005](#)), la transformation de la viande et contrôle des produits ([Piñeiro et al., 2003](#) ; [Gatellier et al., 2014](#)), le stress des animaux à l'abattage ([Franco et al., 2015](#) ; [Cruzen et al., 2015](#)) ; l'étude de la stabilité de la couleur de la viande ([Sayd et al., 2006](#) ; [Kwasiborski et al., 2008b](#) ; [Joseph et al., 2012](#) ; [Desai et al., 2014](#) ; [Suman et al., 2014](#) ; [Canto et al., 2015](#)) et l'oxydation des protéines ([Promeyrat et al., 2011](#)).

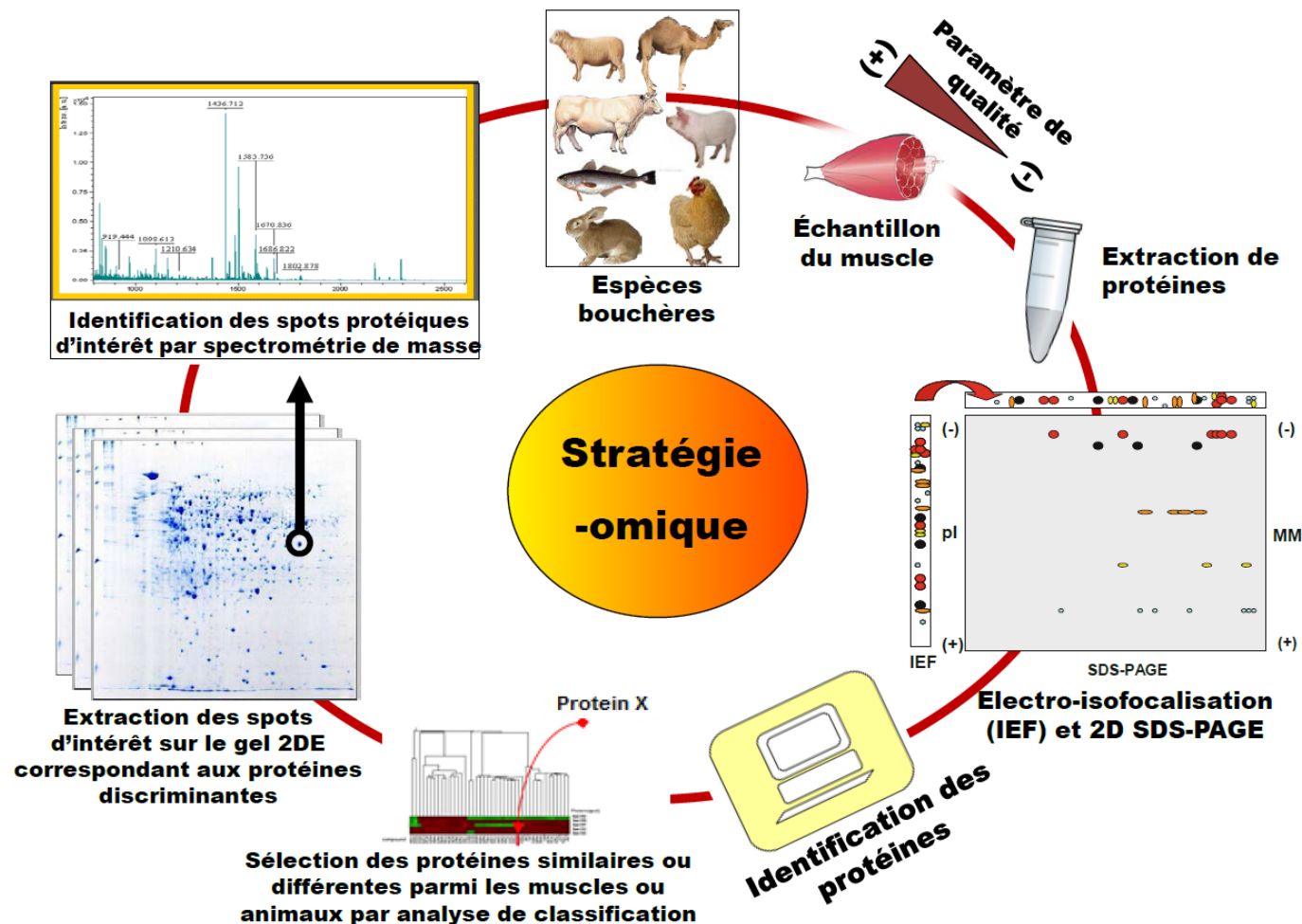


Figure 28. Stratégie protéomique appliquée sur les espèces bouchères. Démarche synthétique à suivre pour révéler les changements biochimiques *post-mortem* et/ou découvrir des protéines biomarqueurs de la qualité sensorielle et des paramètres technologiques de la viande.

A partir d'une espèce bouchère donnée un échantillon de muscle classé sur la base d'un critère de qualité supérieur (+) ou inférieur (-) est utilisé pour extraire les protéines myofibrillaires et/ou sarcoplasmiques. L'extrait protéique est par la suite utilisé pour la réalisation d'un gel d'électrophorèse bidimensionnelle après une isoélectrofocalisation. Les images des gels colorés au bleu Coomassie ou nitrate d'argent seront par la suite traités et les spots d'intérêt seront analysés statistiquement. Les plus discriminants seront excisés du gel pour les identifier par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF par exemple. Les protéines identifiées serviront d'une part comme marqueurs du critère de qualité recherché ou d'autre part à comprendre les mécanismes biologiques sous-jacents.

De plus, depuis les années 2000, de nombreuses études de protéomique (Clarke *et al.*, 2001 ; Lametsch *et al.*, 2003 ; Doherty *et al.*, 2004 ; Picard *et al.*, 2010, 2012, 2013 ; Ouali *et al.*, 2013), ont été mises en œuvre pour identifier des protéines biomarqueurs reliées à des caractères d'intérêt comme les qualités de la viande afin de développer des outils prédictifs simples et efficaces mais surtout non dommageables. Les caractères ciblés et leurs facteurs de variation peuvent différer selon les objectifs de chaque qualité ou filière, mais les démarches suivies sont assez similaires (Tableau 02). Ceci est d'autant plus vrai, pour la compréhension des modifications du protéome associées aux paramètres de la qualité ou l'identification de biomarqueurs explicatifs ou prédictifs comme schématisé dans la Figure 28.

Dans ce qui suit vont être alors présentées les différentes applications de la protéomique, introduites ci-dessus, afin de mieux comprendre le protéome de la viande, la composante responsable en grande partie du déterminisme des qualités recherchées. Le Tableau 03 synthétise les différentes protéines révélées par les études protéomiques chez différentes espèces bouchères notamment le bovin et le porc. Ce tableau de synthèse sera la référence pour cette partie, par conséquent, je ne développerai pas l'ensemble des travaux au cas par cas mais plutôt des focus sur les principaux résultats qui vont être abordés.

IV.6. La protéomique et les modifications du protéome associées aux paramètres de la qualité de la viande

Les attentes du consommateur, du distributeur et du transformateur en matière de qualité sont convergentes : une viande tendre, sans exsudat, ne réduisant pas à la cuisson, plus ou moins grasse et de couleur rose homogène. Quel est donc l'apport de la protéomique pour comprendre ces critères de qualité très variables et évolutifs ?

IV.6.1. La tendreté

Bien que les processus biologiques qui contrôlent la qualité de la viande bovine soient connus (Guillemin *et al.*, 2009 ; Ouali *et al.*, 2013 ; Hocquette *et al.*, 2014) et qu'un certain nombre de QTL (*Quantitative Trait Loci*) aient été déterminés, le contrôle de la variabilité de la tendreté demeure un défi majeur pour la filière viande et en particulier bovine. Parmi les qualités sensorielles, la tendreté, et de façon plus générale la texture de la viande, reste, encore aujourd'hui, la qualité la plus recherchée par les consommateurs. La relation entre protéolyse *post-mortem* des protéines musculaires et texture finale de la viande est largement

Tableau 03. Liste non exhaustive de marqueurs protéiques identifiés par analyse protéomique et associés à la variabilité de quelques paramètres de la qualité de la viande. Majoritairement, se sont les biomarqueurs du muscle *Longissimus* de différentes espèces bouchères qui ont été illustrés. Quelques biomarqueurs du muscle *Pectoralis* du poulet ont été aussi rapportés.

Biomarqueurs	Paramètre de qualité	Espèce	Direction ¹	Références
Protéines de stress thermique (Heat shock proteins, Hsp)				
Hsp20	FCWB	Bovine	+	(Zapata <i>et al.</i> , 2009)
			+	(Guillemin <i>et al.</i> , 2011)
			*	(Polati <i>et al.</i> , 2012)
Hsp27	FCWB	Bovine	+	(Kim <i>et al.</i> , 2008)
	FCWB	Bovine	*	(Polati <i>et al.</i> , 2012)
	FCWB	Porcine	+	(Hwang <i>et al.</i> , 2005)
	Tendreté (S)	Bovine	+/-	(Morzel <i>et al.</i> , 2008)
	LIM	Bovine	-	(Kim <i>et al.</i> , 2008)
	Luminance (<i>L</i> *)	Bovine	-	(Kim <i>et al.</i> , 2008)
	Indice de rouge (<i>a</i> *)	Bovine	-	(Kim <i>et al.</i> , 2008)
	R630/580	Bovine	+	(Joseph <i>et al.</i> , 2012)
α B-crystallin	FCWB	Bovine	+	(Zapata <i>et al.</i> , 2009)
	FCWB	Bovine	-	(Guillemin <i>et al.</i> , 2011)
	FCWB	Bovine	*	(Polati <i>et al.</i> , 2012)
	Tendreté (S)	Bovine	+/-	(Morzel <i>et al.</i> , 2008)
	Luminance (<i>L</i> *)	Porcine	-	(Hwang <i>et al.</i> , 2005)
	Pertes à la cuisson	Porcine	+	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
Hsp40	Tendreté (S)	Bovine	-	(Bernard <i>et al.</i> , 2007)
Hsp60	Pertes en eau	Porcine	+	(Te Pas <i>et al.</i> , 2013)
Hsp70-8	Capacité de rétention d'eau	Porcine	-	(Di Luca <i>et al.</i> , 2013)
Hsp70-1A/B	FCWB	Bovine	+	(Bjarnadottir <i>et al.</i> , 2012)
	Luminance (<i>L</i> *)	Porcine	-	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
	Pertes en poids	Porcine	-	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
Hsp70	Pertes en eau	Porcine	-	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
	Capacité de rétention d'eau	Volaille	+	(Phongpa-Ngan <i>et al.</i> , 2011)
Hsp70-Grp75	FCWB	Bovine	+	(Jia <i>et al.</i> , 2009)
			-	(Guillemin <i>et al.</i> , 2011)
Hsp90	Luminance (<i>L</i> *)		-	(Zhang <i>et al.</i> , 2014)
	Indice de jaune (<i>b</i> *)		-	(Zhang <i>et al.</i> , 2014)
	pHu	Porcine	+	(Zhang <i>et al.</i> , 2014)
	Pertes à la cuisson		-	(Zhang <i>et al.</i> , 2014)
	Pertes en eau		-	(Zhang <i>et al.</i> , 2014)
	Pertes en eau		-	(Te Pas <i>et al.</i> , 2013)
Métabolisme énergétique				
A) Métabolisme glycolytique				
Enolase 1 (ENO1)	FCWB	Bovine	*	(Polati <i>et al.</i> , 2012)
	Indice de rouge (<i>a</i> *)	Porcine	-	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
Enolase 3 (ENO3)	FCWB	Bovine	-	(Bjarnadottir <i>et al.</i> , 2012)
	FCWB	Bovine	+	(Guillemin <i>et al.</i> , 2011)
	FCWB	Bovine	*	(Polati <i>et al.</i> , 2012)
	Indice de rouge (<i>a</i> *)	Bovine	+	(Joseph <i>et al.</i> , 2012)
	Pertes en poids	Porcine	+	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
Malate dehydrogenase 1 (MDH1)	FCWB	Bovine	-	(Jia <i>et al.</i> , 2009)
	FCWB	Porcine	+	(Laville <i>et al.</i> , 2007)
	pHu	Porcine	+	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
	Pertes en poids	Porcine	+	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
Triosephosphate isomerase 1 (TP1)	FCWB	Porcine	-	(Lametsch <i>et al.</i> , 2003)
	FCWB	Porcine	-	(Laville <i>et al.</i> , 2007)
	FCWB	Porcine	+	(Hwang <i>et al.</i> , 2005)
	FCWB	Volaille	+	(Mekchay <i>et al.</i> , 2010)
	Capacité de rétention d'eau	Porcine	+	(Di Luca <i>et al.</i> , 2013)
	Capacité de rétention d'eau	Volaille	+/-	(Phongpa-Ngan <i>et al.</i> , 2011)
	Pertes en eau	Porcine	+	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	FCWB	Bovine	**	(Polati <i>et al.</i> , 2012)
	Pertes en eau	Porcine	+	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
	pHu	Porcine	+	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
	pHu	Porcine	+	(D'Alessandro <i>et al.</i> , 2011)
	Luminance (<i>L</i> *)	Porcine	-	(D'Alessandro <i>et al.</i> , 2011)

documentée (Ouali, 1990; Sentandreu *et al.*, 2002 ; Kemp *et al.*, 2010, Lonergan *et al.*, 2010).

De nombreux travaux ont mis en évidence des relations entre les propriétés des fibres musculaires et la tendreté. Toutefois, ces relations sont très variables selon le type d'étude. Par exemple, Maltin *et al.* (2003) montrent que plus le muscle *Longissimus lumborum* est oxydatif, plus il est tendre, à l'inverse de ce qui est observé pour le muscle *Vastus lateralis*. L'étude de Picard *et al.* (2006) montre le même type de résultats sur les muscles *Longissimus thoracis* (LT, oxydatif) et *Semitendinosus* (ST, glycolytique). Le muscle LT des vaches apparaît le plus tendre lorsqu'il est riche en lipides totaux et notamment en triglycérides, qu'il présente les propriétés les plus lentes et oxydatives et les teneurs en collagène total et insoluble les plus faibles (Picard *et al.*, 2007). Ceci démontre que selon le type de muscle considéré et sans doute aussi selon le type d'animal et le mode d'élevage, la tendreté de la viande peut être expliquée par des caractéristiques différentes. Ceci permet de comprendre les nombreuses contradictions rencontrées dans la bibliographie sur les relations entre caractéristiques biochimiques du muscle et qualité sensorielle de la viande. En effet, selon les auteurs, les études ont été conduites sur des types de muscles ou d'animaux différents. Ce constat montre également qu'aucune caractéristique d'un muscle donné ne peut être un prédicteur de la qualité sensorielle de l'ensemble des muscles de la carcasse. Ainsi, il apparaît clairement que la tendreté de la viande est très difficile à maîtriser en raison de son origine multifactorielle non totalement élucidée jusqu'à présent.

Par ailleurs, le protéome serait le reflet des différentes voies métaboliques qui contribuent au développement *post-mortem* de la tendreté (Tableau 03). Par conséquent, une meilleure compréhension de ces voies et de leurs interactions est une condition préalable pour une identification satisfaisante de prédicteurs précis de ce critère primaire de qualité de la viande. À cet égard, l'avènement des technologies protéomiques modernes a sans doute contribué à une meilleure compréhension de ces processus (D'Alessandro et Zolla, 2013 ; Picard *et al.*, 2012b ; 2013 ; 2014 ; Bendixen, 2005 ; 2013).

Les principaux résultats (Picard *et al.*, 2012a) ont montré pour le muscle *Longissimus thoracis* (LT, entrecôte) que des protéines associées au type rapide glycolytique (phosphoglucose mutase, lactate déshydrogénase B, triphosphate isomérase, glyceraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase, β énonase, isoformes de la troponine T rapide, isoformes de chaîne lourde de myosine IIx...) sont moins abondantes chez les animaux donnant la viande la plus tendre (T^+). Au contraire, des protéines liées au type lent oxydatif comme la chaîne lourde de

Tableau 03. (Suite)

Biomarqueurs	Paramètre de qualité	Espèce	Direction ¹	Références
A) Métabolisme glycolytique (suite)				
Lactate dehydrogenase B (LDHB)	FCWB	Bovine	*	(Polati <i>et al.</i> , 2012)
	Luminance (<i>L</i> *)	Porcine	-	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
	Pertes en eau	Porcine	+/-	(Te Pas <i>et al.</i> , 2013)
	pHu	Porcine	+	(D'Alessandro <i>et al.</i> , 2011)
Pyruvate kinase (PK)	FCWB	Volaille	+	(Mekchay <i>et al.</i> , 2010)
	Capacité de rétention d'eau	Volaille	+	(Phongpa-Ngan <i>et al.</i> , 2011)
	Capacité de rétention d'eau	Porcine	-	(D'Alessandro <i>et al.</i> , 2011)
	pHu	Porcine	+	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
	Pertes en poids	Porcine	-	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
	Luminance (<i>L</i> *)	Porcine	-	(D'Alessandro <i>et al.</i> , 2011)
	Indice de rouge (<i>a</i> *)	Porcine	-	(D'Alessandro <i>et al.</i> , 2011)
	Indice de jaune (<i>b</i> *)	Porcine	-	(D'Alessandro <i>et al.</i> , 2011)
Phosphoglucomutase 1 (PGM1)	Indice de rouge (<i>a</i> *)	Porcine	-	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
	Pertes en poids		+	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
	Capacité de rétention d'eau		+/-	(Di Luca <i>et al.</i> , 2013)
B) Métabolisme oxydatif				
Aldehyde dehydrogenase (ALDH)	pHu	Porcine	+	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
	Pertes en eau	Porcine	+	
	Indice de rouge (<i>a</i> *)	Porcine	-	
	Pertes à la cuisson	Porcine	+	
	Pertes en poids	Porcine	-	
Creatine kinase M type (CKM)	FCWB	Bovine	-	(Zapata <i>et al.</i> , 2009)
	FCWB	Bovine	-	(Bjarnadottir <i>et al.</i> , 2012)
	FCWB	Bovine	*/**	(Polati <i>et al.</i> , 2012)
	Capacité de rétention d'eau	Porcine	-	(van de Wiel et Zhang 2007)
	Capacité de rétention d'eau	Porcine	+	(Di Luca <i>et al.</i> , 2013)
	Capacité de rétention d'eau	Porcine	+	(D'Alessandro <i>et al.</i> , 2011)
	Pertes en poids	Porcine	+	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
	pHu	Porcine	-	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
	Indice de rouge (<i>a</i> *)	Bovine	+	(Joseph <i>et al.</i> , 2012)
	Indice de rouge (<i>a</i> *)	Porcine	+/-	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
	Indice de rouge (<i>a</i> *)	Porcine	+	(D'Alessandro <i>et al.</i> , 2011)
Succinate dehydrogenase (SDH)	Tendreté (S)	Bovine	+	(Morzel <i>et al.</i> , 2008)
Pyruvate dehydrogenase (PDH)	Indice de rouge (<i>a</i> *) R630/580	Bovine	+	(Joseph <i>et al.</i> , 2012)
Aldose reductase (ALDR1)	FCWB	Porcine	-	(Laville <i>et al.</i> , 2007)
	Indice de rouge (<i>a</i> *)	Bovine	+	(Joseph <i>et al.</i> , 2012)
Isocitrate dehydrogenase (ICDH)	Luminance (<i>L</i> *)	Porcine	+	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
	Pertes en eau		+/-	(te Pas <i>et al.</i> , 2013)
Adenylate kinase (ADK)	FCWB	Porcine	+	(Laville <i>et al.</i> , 2007)
	FCWB	Porcine	+	(Hwang <i>et al.</i> , 2005)
	Pertes en eau	Porcine	-	(Hwang <i>et al.</i> , 2005)
	Pertes en eau	Porcine	-	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
Stress oxydatif et détoxification				
DJ-1	FCWB	Bovine	+	(Jia <i>et al.</i> , 2009)
	FCWB	Bovine	*	(Polati <i>et al.</i> , 2012)
	Pertes en eau	Porcine	-	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
	Pertes en poids	Porcine	-	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
	Luminance (<i>L</i> *)	Porcine	-	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
Peroxiredoxin 1 (Prdx1)	FCWB	Bovine	*	(Polati <i>et al.</i> , 2012)
Peroxiredoxin 2 (Prdx2)	FCWB	Porcine	+	(Hwang <i>et al.</i> , 2005)
	R630/580	Bovine	+	(Joseph <i>et al.</i> , 2012)
SP-22 (Prdx3)	FCWB	Porcine	+	(Hwang <i>et al.</i> , 2005)
	Pertes en eau	Porcine	-	
	Luminance (<i>L</i> *)	Porcine	-	
Peroxiredoxin 6 (Prdx6)	FCWB	Bovine	-	(Jia <i>et al.</i> , 2009)
	FCWB	Bovine	+	(Guillemin <i>et al.</i> , 2011)
	pHu	Porcine	+	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
	Indice de rouge (<i>a</i> *)	Porcine	-	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
	Pertes en poids	Porcine	-	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)

myosine lente, plusieurs enzymes mitochondriales comme la succinate déshydrogénase ou la sous unité 1 de la cytochrome b-c1, sont plus abondantes dans les muscles LT les plus tendres (Morzel *et al.*, 2008 ; Picard *et al.*, 2012b, Ouali *et al.*, 2013).

Plusieurs protéines impliquées dans le métabolisme et les flux de calcium telles que la parvalbumine (Bouley *et al.*, 2004) ou l'annexine A6 (Bjarnadottir *et al.*, 2012) ont également été identifiées comme marqueurs positifs de la tendreté, en accord avec le rôle important que joue le calcium dans la maturation de la viande (Ouali, 1992).

Des protéines de la famille des Heat Shock (α B-crystalline, Hsp20, Hsp27, Hsp40, Hsp70), protéines de choc thermique, ont été révélées comme marqueurs de la tendreté dans différentes expérimentations (Hwang *et al.*, 2005 ; Morzel *et al.*, 2008 ; Kim *et al.*, 2008 ; Polati *et al.*, 2012). Ces résultats sont en accord avec la première phase d'attendrissage, l'apoptose ou mort cellulaire programmée, selon laquelle l'activité antiapoptotique des Hsp pourrait ralentir le processus de mort des cellules en phase *post-mortem* précoce et jouer ainsi un rôle prépondérant dans le déterminisme de la tendreté (Ouali *et al.*, 2006, 2013). D'autres protéines impliquées dans le stress oxydant, telles que la superoxyde dismutase (SOD1) ou les peroxiredoxines (PRDX) sont reliées négativement à la tendreté (Hwang *et al.*, 2005 ; Jia *et al.*, 2009 ; Guillemin *et al.*, 2011 ; Polati *et al.*, 2012 ; Guillemin *et al.*, 2011).

Par ailleurs, il est connu que l'accumulation *post-mortem* de calcium dans le sarcoplasme active les calpaïnes (enzymes protéolytiques) qui interviennent dans la dégradation de protéines myofibrillaires, induisant une désorganisation de l'ultrastructure. L'utilisation de l'analyse protéomique a apporté de nouvelles connaissances sur les phénomènes protéolytiques. Dans la plupart des études entreprises, la présence de fragments protéiques du cytosquelette a été observée dès les premiers prélèvements *post-mortem* (Morzel *et al.*, 2004 ; Sayd *et al.*, 2006). En outre, Lametsch *et al.* (2003) ont identifié des changements significatifs dans l'actine, la myosine lourde chaîne, la titine, la myosine à chaîne légère (MLC) I et II, la CapZ et la cofiline au cours du stockage *post-mortem* de la viande. Les auteurs suggèrent dès les premières investigations une éventuelle relation entre la dégradation *post-mortem* de l'actine et la myosine lourde chaîne, et la tendreté de la viande.

En utilisant des techniques similaires, Hwang *et al.* (2005) ont trouvé 16 spots protéiques corrélées aux mesures de la force de cisaillement de Warner-Bratzler (FCWB), beaucoup d'entre eux corroborent avec les conclusions de Lametsch *et al.* (2003). Quelques années après, d'autres études, ont confirmé le rôle de la dégradation de l'actine au cours du

Tableau 03. (Suite)

Biomarqueurs	Paramètre de qualité	Espèce	Direction ¹	Références
Stress oxydatif et détoxification (suite)				
Superoxide Dismutase (SOD)	Pertes en poids	Porcine	-	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
	Pertes en eau		-	(Te Pas <i>et al.</i> , 2013)
Carbonic anhydrase (CA3)	FCWB	Bovine	**	(Polati <i>et al.</i> , 2012)
	Pertes en poids	Porcine	-	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
Protéines du cytosquelette (structure)				
Myosin light chain 1 (MLC1)	FCWB	Bovine	+	(Bjarnadottir <i>et al.</i> , 2012)
	FCWB	Bovine	-	(Jia <i>et al.</i> , 2009)
	FCWB	Bovine	+/-	(Polati <i>et al.</i> , 2012)
	FCWB	Porcine	+	(Hwang <i>et al.</i> , 2005)
	Luminance (<i>L</i> *)	Porcine	-	(Hwang <i>et al.</i> , 2005)
	Pertes en eau	Porcine	-	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
Myosin light chain 2 (MLC2)	FCWB	Bovine	+	(Zapata <i>et al.</i> , 2009)
	FCWB	Bovine	-	(Bjarnadottir <i>et al.</i> , 2012)
	FCWB	Bovine	+/-	(Polati <i>et al.</i> , 2012)
	FCWB	Porcine	+	(Lametsch <i>et al.</i> , 2003)
	Pertes en eau	Porcine	-	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
	Pertes à la cuisson	Porcine	+	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
	Pertes en poids	Porcine	-	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
Troponin C	FCWB	Bovine	+	(Zapata <i>et al.</i> , 2009)
Troponin T	FCWB	Porcine	+	(Hwang <i>et al.</i> , 2005)
	FCWB	Bovine	+	(Polati <i>et al.</i> , 2012)
	Pertes en eau	Porcine	-	(Hwang <i>et al.</i> , 2005)
	Pertes à la cuisson	Porcine	+/-	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
	Luminance (<i>L</i> *)	Porcine	-	(Hwang <i>et al.</i> , 2005)
	Indice de rouge (<i>a</i> *)	Porcine	+	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
	Myosin heavy chain 1 (MHC1)	FCWB	Bovine	-
-				(Guillemin <i>et al.</i> , 2011)
+/-				(Polati <i>et al.</i> , 2012)
Myosin heavy chain 2 (MHC2)	FCWB	Bovine	-	(Zapata <i>et al.</i> , 2009)
Myosin heavy chain 4 (MHC4)	FCWB	Porcine	-	(Lametsch <i>et al.</i> , 2003)
Myosin heavy chain 7 (MHC7)	FCWB	Bovine	-	(Zapata <i>et al.</i> , 2009)
		Bovine	+	(Guillemin <i>et al.</i> , 2011)
Titin	Capacité de rétention d'eau	Porcine	+/-	(Di Luca <i>et al.</i> , 2013)
Desmin	FCWB	Bovine	-	(Zapata <i>et al.</i> , 2009)
	FCWB	Bovine	-	(Guillemin <i>et al.</i> , 2011)
	Capacité de rétention d'eau	Porcine	+	(van de Wiel et Zhang, 2007)
Tubulin β	FCWB	Bovine	-	(Zapata <i>et al.</i> , 2009)
CapZ- β	FCWB	Porcine	+	(Hwang <i>et al.</i> , 2005)
α -actin	FCWB	Bovine	-	(Zapata <i>et al.</i> , 2009)
	FCWB	Bovine	+	(Bjarnadottir <i>et al.</i> , 2012)
	FCWB	Porcine	-	(Lametsch <i>et al.</i> , 2003)
	FCWB	Porcine	+	(Hwang <i>et al.</i> , 2005)
	FCWB	Bovine	+/-	(Polati <i>et al.</i> , 2012)
	Tendreté (S)	Bovine	+	(Morzel <i>et al.</i> , 2008)
	Luminance (<i>L</i> *)	Porcine	-	(Hwang <i>et al.</i> , 2005)
Myosin binding protein-H (MyBP-H)	FCWB	Bovine	+	(Guillemin <i>et al.</i> , 2011)
	Tendreté (S)	Bovine	+	(Morzel <i>et al.</i> , 2008)
Cofilin 2	FCWB	Porcine	+	(Hwang <i>et al.</i> , 2005)
	Pertes en poids		-	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
Protéolyse				
μ -calpain	Tendreté (S)	Bovine	-	(Guillemin <i>et al.</i> , 2011)
	FCWB		+/-	(Picard <i>et al.</i> , 2014)
m-calpain	Tendreté (S)	Bovine	-	(Guillemin <i>et al.</i> , 2011)
Proteasome	Pertes en eau	Porcine	+	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)

développement de la tendreté de la viande (Morzel *et al.*, 2008 ; Zapata *et al.*, 2009). Le rôle d'autres protéines du cytosquelette dans l'attendrissage de la viande, notamment la troponine T, la desmine, la myosine, la protéine de liaison H (MyBP-H), et la tubuline ou leurs fragments a été aussi rapporté (Hwang *et al.*, 2005 ; Hollung *et al.*, 2007 ; Morzel *et al.*, 2008 ; Zapata *et al.*, 2009).

IV.6.2. La couleur

La couleur de la viande fraîche est une combinaison de la teneur en myoglobine et de la lumière réfléchiée sur la surface d'un morceau de viande affecté par la dénaturation des protéines (Aaslyng *et al.*, 2002). Ainsi, les approches protéomiques ont été proposées pour aider à comprendre le protéome du muscle et les changements associés à la stabilité et au développement de la couleur. Par exemple, Hwang (2004) et Hwang *et al.* (2005) ont étudié l'implication des changements de protéome du muscle *Longissimus* du porc sur des viandes DFD (*Dark, Firm, Dry* ou viandes sombres, fermes et sèches) et PSE (*Pale, Soft, Exsudative* ou viandes pales, molles et exsudatives). La désoxyribonucléase I chaîne A, l' α -actine, et la troponine T ont été proposés comme de bons indicateurs pour discriminer la viande normale et PSE. Les résultats indiquent que la viande PSE est caractérisée par de faibles abondances de l' α -actine, et de la troponine T, et une surabondance de la désoxyribonucléase I chaîne A.

Dans une autre étude conduite par Sayd *et al.* (2006), la surabondance de fragments de créatines kinases et d'énolases dans des muscles de porc prélevés très tôt après la mort et générant une viande foncée a conduit à formuler une hypothèse selon laquelle cette protéolyse exacerbée était liée au métabolisme plus oxydatif par ailleurs traduit par la plus grande quantité d'enzymes mitochondriales de la chaîne respiratoire. Dans leur étude, les auteurs ont recherché grâce à une étude protéomique les mécanismes biochimiques responsables de la variation de la couleur (Sayd *et al.*, 2006). Ils ont révélé 22 protéines ou fragments différemment abondant dans le muscle *Semimembranosus* du porc entre une viande claire et foncée. Les muscles menant à une viande plus foncée sont plus oxydatifs et caractérisés par une abondance des enzymes mitochondriales de la chaîne respiratoire, l'hémoglobine, et quelques chaperonnes moléculaires (Hsp27, α B-cristalline, et Hsp70/Grp58). Inversement, les enzymes de la glycolyse étaient surexprimés dans le groupe de viande claire. Ce groupe à luminance (L^*) élevée a également été caractérisé par des niveaux élevés de glutathion-S-transférase ω et de cyclophilin D.

Tableau 03. (Suite et fin)

Biomarqueurs	Paramètre de qualité	Espèce	Direction ¹	Références
Transport et voies de signalisation				
Serum albumin	Capacité de rétention d'eau	Porcine	+	(Di Luca <i>et al.</i> , 2013)
	Pertes à la cuisson	Porcine	-	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
Serotransferrin	FCWB	Bovine	+	(Bjarnadottir <i>et al.</i> , 2012)
	Capacité de rétention d'eau	Porcine	+	(Di Luca <i>et al.</i> , 2013)
	Pertes à la cuisson	Porcine	-	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
	Luminance (<i>L</i> *)	Porcine	+	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
Hemoglobin	FCWB	Porcine	+	(Hwang <i>et al.</i> , 2005)
	Pertes à la cuisson	Porcine	+	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
Parvalbumin	Tendreté (<i>S</i>)	Bovine	+	(Bouley <i>et al.</i> , 2004)
	Luminance (<i>L</i> *)	Porcine	+	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
	Pertes en poids	Porcine	+	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
	Pertes en eau	Porcine	-	(Te Pas <i>et al.</i> , 2013)
Myoglobin	FCWB	Bovine	+/-	(Polati <i>et al.</i> , 2012)
	Pertes en eau	Porcine	-	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
	Pertes en poids	Porcine	-	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
	Luminance (<i>L</i> *)	Porcine	-	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
Fatty acid-Binding protein (FABP)	Indice de rouge (<i>a</i> *)	Porcine	-	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
	FCWB	Porcine	-	(Laville <i>et al.</i> , 2007)
	FCWB	Bovine	+/-	(Polati <i>et al.</i> , 2012)
	Pertes en eau	Porcine	-	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
	Lipides intramusculaires	Porcine	+	(Damon <i>et al.</i> , 2006)
Apoptose ²				
Annexin A4	Pertes en poids	Porcine	-	(Kwasiborski <i>et al.</i> , 2008)
Annexin A6	FCWB	Bovine	+	(Bjarnadottir <i>et al.</i> , 2012)
SERPINA3	Pertes en eau	Porcine	+	(Te Pas <i>et al.</i> , 2013)
	pHu		+/-	
Galectin-1	FCWB	Bovine	+	(Bjarnadottir <i>et al.</i> , 2012)
Inositol 1,4,5-triphosphate receptor type 1 (IP3R1)	pHu	Bovine	+	(Kim <i>et al.</i> , 2008)
	Lipides intramusculaires	Bovine	-	

¹ (+) associé positivement; (-) associé négativement; (+/-) associé positivement et/ou négativement en fonction de l'isoforme protéique ; (*) une surexpression du biomarqueur a été rapporté ; (**) une sous-expression du biomarqueur a été rapporté.

² Parmi les protéines de stress thermique, du transport et voies de signalisation et de stress oxydatif, nombreuses sont celles qui sont aussi impliquées dans la voie apoptotique.

Abréviations: FCWB: Force de Cisaillement de Warner-Bratzler; LIM: lipides intramusculaires.

En outre, [Kwasiborski et al. \(2008\)](#) ont identifié une isoforme de myoglobine et une protéine de choc thermique (Hsp72), qui expliquent à elles seules 84% de la variabilité de la Luminance (L^*). Cette étude a également révélé une isoforme de la créatine kinase musculaire (CKM) et une protéine de liaison calcique qui pourrait expliquer 47 et 69%, respectivement, de la variabilité dans la viande à couleur rouge (indice de rouge, a^*) chez les porcs mâles et femelles, respectivement.

Récemment, [Joseph et al. \(2011\)](#) ont caractérisé les protéines sarcoplasmiques de la viande de bœuf à couleur stable (*Longissimus thoracis*) et à couleur labile (*Psoas major*) et ont identifié 16 protéines discriminant les deux groupes : des protéines anti-oxydantes et des chaperonnes. Ils ont trouvé une corrélation positive entre les protéines sous-abondantes (aldose réductase, créatine kinase et β -énolase) et l'indice de rouge (a^*) et aussi avec la stabilité de la viande (peroxiredoxine 2, Hsp27) et une corrélation négative entre a^* et l'aconitase mitochondriale. Deux récentes revues de [Suman et al. \(2014\)](#) et [Joseph et al. \(2015\)](#) synthétisent l'apport de la protéomique pour l'étude de la stabilité et le développement de la couleur de la viande.

IV.6.3. La capacité de rétention d'eau (CRE)

La capacité (ou pouvoir) de rétention en eau (CRE) de la viande est due pour 97% aux protéines myofibrillaires. Il s'agit de la capacité qu'a la viande à retenir fortement sa propre eau ou de l'eau ajoutée, et ce lors de l'application d'une force quelconque ([Honikel et Hamm, 1994](#)). En effet, la myosine, l'actine et, dans une moindre mesure la tropomyosine, sont les principaux composants musculaires capables de fixer l'eau ([Owens et al., 2000](#)). Il a été aujourd'hui clairement montré que les événements *post-mortem*, à savoir l'amplitude et la vitesse de chute de pH, la protéolyse et même l'oxydation des protéines sont les facteurs clés qui influencent la capacité d'une viande à retenir son eau ([Huff-Lonergan et Lonergan, 2005](#)).

En utilisant une approche protéomique, [Hwang \(2004\)](#) a montré une forte relation entre les pertes en eaux élevées et la vitesse de protéolyse *post-mortem* du muscle long dorsal du porc. Quatre protéines, la troponine T, l'adénylate kinase, l'adénosine triphosphate (ATP) - protéinase dépendante SP-22 (actuellement répertorié sous le nom Prdx3), et la protéine DJ-1 codée par *PARK7*, sont toutes liées aux altérations de CRE. Dans une autre étude, [van de Wiel et Zhang, \(2007\)](#) ont analysé le protéome du muscle de porc et ont identifié des marqueurs protéiques candidats pour expliquer les mécanismes responsables du processus de pertes en eau. Les protéines les plus pertinentes étaient la créatine phosphokinase type M, la desmine et

un activateur de la transcription. Les échantillons ayant de fortes pertes en eau sont caractérisés par une surexpression de la créatine phosphokinase type M, induisant une chute rapide de pH et une altération de la vitesse de la contraction musculaire. De plus, il a été suggéré que les taux élevés de desmine observés dans les échantillons de faible rétention d'eau augmentent le rétrécissement latéral des myofibrilles au cours de l'installation de la rigidité cadavérique et la modification associée de la compartimentalisation de l'eau dans le tissu musculaire, induisant des fuites d'eau considérables.

Phongpa-Ngan *et al.* (2011) ont analysé l'abondance des protéomes issus de groupes de poulets à différentes CRE par 2DE et MALDI-TOF-MS. 22 protéines ont été identifiées et 5 étaient surabondantes, dont 4 spots dans le groupe à haute CRE et une protéine sous abondante dans le groupe de faible CRE. Les protéines, dont certaines ont été énumérées dans le Tableau 03, concernent des enzymes du métabolisme, comme la pyruvate kinase, la triosephosphate isomérase et des protéines du choc thermique (HSPs). Pour tester l'importance des protéines de choc thermique dans le phénomène des pertes en eau, Yu *et al.* (2009) ont testé quatre HSP (α B-cristalline, Hsp27, Hsp70 et Hsp90) dont l'abondance mesurée par un test ELISA dans le muscle long dorsal de porcs avaient tendance à diminuer après le transport des animaux. Les auteurs ont trouvé une étroite relation entre la baisse de l'expression des HSP et l'augmentation des pertes en eau, indiquant ainsi que la réponse de choc thermique *post-mortem* est étroitement liée à la CRE chez le porc.

Une autre équipe de recherche Irlandaise, a pu mettre en évidence une liste de 20 spots protéiques en utilisant la DIGE pour caractériser les exsudats de viandes (Di Luca *et al.*, 2013 a,b). Ces résultats suggèrent que l'exsudat peut être utilisé afin de développer des biomarqueurs à des fins industrielles. Ils ont trouvé que 44 protéines expriment un changement d'abondance durant la période *post-mortem*, mais c'est uniquement l'abondance de Hsp70 qui s'est avérée liée à la CRE. De ce fait, ils ont suggéré que l'expression de la chaperonne Hsp70, révélée dans le groupe à faible pertes en eau, peut jouer un rôle protecteur vis-à-vis de la dénaturation et l'agrégation des protéines.

IV.6.4. Autres qualités

La protéomique a été aussi appliquée pour l'étude de nombreux autres paramètres affectant la qualité de la viande, comme les lipides intramusculaires (Damon *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 2008), le pH (Damon *et al.*, 2006 ; 2013 ; Kwasiborski *et al.*, 2008 ; Kim *et al.*, 2008 ; Lebret *et al.*, 2013 ; te Pas *et al.*, 2013) et l'oxydation des protéines (Promeyrat *et al.*, 2011).

Par exemple, [Damon et al. \(2006\)](#) ont mis en évidence une corrélation positive entre le niveau de la protéine FABP4 (« *Fatty Acid Binding Protein* » adipocytaire) et le nombre d'adipocytes intramusculaires ($R^2 = 0,47$, $P < 0,05$) ainsi qu'avec la teneur en LIM ($R^2 = 0,65$, $P < 0,0001$). Par ailleurs, chez les porcs de race Basque, le système d'élevage extensif comparativement au système conventionnel induit une surexpression de gènes relatifs à la structure du muscle (γ filamine, nébuline...), à la réponse thermique et au stress environnemental (Hsp de faible poids moléculaire) ([Lebret et al., 2013](#)).

L'analyse du protéome sarcoplasmique musculaire a aussi révélé que l'oxydation des protéines pendant la maturation et la cuisson des viandes, qui peut altérer la tendreté et la qualité technologique, est limitée par l'abondance de protéines du système antioxydant (« selenium bindingprotein », SuperOxide Dismutase (SOD) mitochondriale) et de protéines contenant du fer (isoformes de myoglobine, sérotransferrine) ([Promeyrat et al., 2011](#)).

IV.7. La protéomique pour comprendre les facteurs influençant les qualités de la viande

La qualité de la viande est une composante complexe influencée par une multitude de facteurs qui interagissent entre eux. Il s'agit par exemple de : la génétique, l'alimentation, la manipulation *pré-mortem* des animaux, la manipulation des carcasses *post-mortem*, les traitements technologiques, et de leurs interactions ([Rosenfold et Andersen, 2003](#); [Lawrie et Ledward, 2006](#) ; [Hocquette et al., 2012](#)). Pour la tendreté, le critère le plus recherché, la maturation est l'étape la plus critique pour optimiser la qualité. Les analyses protéomiques ont par conséquent considérablement aidé les chercheurs à élucider les voies biochimiques et les mécanismes qui régissent certains facteurs. Cette partie développera les progrès issus de ces analyses pour une meilleure compréhension des mécanismes.

IV.7.1. Modifications du protéome dues aux conditions *pré-mortem*

IV.7.1.1. Variabilité génétique

L'influence génétique sur la qualité comprend les différences entre les races ainsi que les différences entre les individus de la même race ([Rosenfold et Andersen, 2003](#)). Chez le porc, une mutation sur le gène du canal calcique à la ryanodine (allèle *n*) à l'origine de graves bouleversements métaboliques conduit à des défauts qualitatifs importants de la viande ([Monin et Laborde, 1985](#)). Cette mutation ponctuelle est responsable de potentiel glycolytique du muscle élevé dans la viande de porc ou la grande disponibilité de glycogène contribue à une forte baisse de pH. Ainsi, le génotype mutant RN^- provoque une augmentation du

glycogène musculaire avec des effets indésirables sur les rendements de qualité et de transformation de la viande (Scheffler et Gerrard, 2007). L'analyse protéomique a été conduite pour investiguer ce problème (Hedegaard *et al.*, 2004) et les résultats ont révélé que l'enzyme clé de la synthèse du glycogène, l'uridine diphosphate (UDP)-glucose pyrophosphorylase, était significativement surexprimée chez les animaux porteurs. Les différences dans les profils d'expression des enzymes liées à la glycolyse et du cycle de Krebs ont également été observées, ce qui suggère que l'hyper-accumulation de glycogène induite par la mutation RN^- est due à une synthèse accrue de glycogène.

IV.7.1.2. Croissance musculaire

La croissance et le développement du tissu musculaire sont d'autres facteurs qui contribuent au développement de la qualité de la viande. Par exemple, des mutations naturelles dans certaines races bovines bloquent l'activité de la myostatine, un facteur de croissance qui limite la croissance musculaire. Cette mutation est associée au phénotype de l'hypertrophie musculaire (Kambadur *et al.*, 1997). Les modifications dans l'expression des protéomes du muscle induites par l'hypertrophie musculaire ont été décrites chez le bovin et l'ovin (Bouley *et al.*, 2005; Hamelin *et al.*, 2006). Les deux études, en utilisant une stratégie protéomique, ont pu apporter des réponses aux mécanismes provoquant ce phénomène. D'autres études du protéome en relation avec la croissance musculaire chez d'autres espèces telles que le poulet ont été rapportées. Par exemple, Doherty *et al.* (2004) ont évalué le profil des protéines solubles du muscle pectoral du poulet afin de définir après l'éclosion des œufs, les changements de la composante protéique survenant au cours du développement. Les auteurs rapportent qu'une croissance supérieure à 27 jours provoque des modifications radicales dans les niveaux d'expression de protéines.

IV.7.1.3. Alimentation (régime alimentaire)

L'alimentation comme stratégie de gestion de la qualité, a été activement utilisée, non seulement en relation avec la qualité des carcasses (Andersen *et al.*, 2005), mais aussi pour son effet sur la couleur et la composition en acides gras (Scollan *et al.*, 2006). Afin, de mieux comprendre la relation entre la croissance compensatoire et la tendreté, Lametsch *et al.* (2006) optent pour une stratégie protéomique pour étudier l'influence de ce facteur sur le protéome musculaire. À l'abattage, il s'est avéré que de nombreuses protéines sont affectées, à savoir : Hsp70, Hsp27, enolase 3, glycérol-3-phosphate déshydrogénase, aldéhyde déshydrogénase E2 et E3, et la biphosphoglycerate. À 48 h *post-mortem*, d'autres protéines sont aussi affectées.

Les auteurs ont donc suggéré que ces protéines peuvent jouer un rôle considérable dans la composition du muscle, notamment en protéines de structure et peuvent par conséquent avoir un effet sur la tendreté. D'autres stratégies protéomiques ont aussi été utilisées pour étudier l'effet du régime sur le protéome du poulet de chair (Corzo *et al.*, 2006) et des protéines marqueurs ont été identifiés. Une autre étude récente, a montré que le protéome des poulets ayant eu un régime supplémenté par un probiotique a été influencé, notamment pour les protéines de la voie glycolytique (Zheng *et al.*, 2015). L'étude a permis d'apporter de nouvelles connaissances sur le rôle que les probiotiques peuvent jouer sur la qualité.

IV.7.1.4. Conditions de manipulation *pré-abattage* des animaux

La manipulation avant l'abattage consiste à mélanger des animaux non familiers, le chargement dans les camions, le transport sur de longues distances et la stabulation à l'abattoir. Ces pratiques de *pré-abattage* peuvent induire un stress psychologique ou physique. Le stress avant l'abattage est à la fois une question de bien-être animal et un problème de qualité, car l'implication du stress avant l'abattage sur les défauts majeurs de qualité des viandes est bien connue (Rosenvold et Andersen, 2003 ; Terlouw, 2005 ; 2015 ; Franco *et al.*, 2015). Par exemple, Morzel *et al.* (2004) ont étudié l'influence des conditions de transport (un jour ou immédiatement avant l'abattage) sur les modifications du protéome de muscle long dorsal du porc. L'ATPase mitochondriale était surexprimée dans le groupe transporté immédiatement avant l'abattage, caractérisé par une chute du pH rapide et une modification prononcée du pI de MLC II. L'augmentation de l'abondance de MLC II peut être une conséquence de sa phosphorylation (Morzel *et al.*, 2004). Il a été par ailleurs rapporté que la phosphorylation de la MLC affecte la sensibilité de la contraction musculaire au Ca^{2+} , et que les modifications *post-mortem* sur la phosphorylation de la MLC pourraient ainsi affecter la texture de la viande (Lametsch *et al.*, 2006).

D'autres études protéomiques sur les manipulations avant l'abattage ont étudié l'influence des conditions d'élevage (intérieur ou extérieur) sur l'expression des protéines du muscle *Longissimus lumborum* (Kwasiborski *et al.*, 2008a). Les résultats indiquent que l'élevage en plein air (extérieur) induit de faibles abondances des enzymes de la voie glycolytique, suggérant un métabolisme plus oxydatif. Les recherches sur les modifications des protéines musculaires induites par les traitements *pré-abattage* ont également été conduites sur le poisson (Morzel *et al.*, 2006). L'effet de deux procédures de *pré-abattage* (activité limitée ou 15 minutes d'activité musculaire intense) sur les protéines musculaires de la truite a été étudié

à 45 min et 24 h *post-mortem*. Les protéines différenciellement abondantes entre les deux groupes de poissons correspondaient principalement aux protéines impliquées dans les voies du métabolisme énergétique (énolase, pyruvate déshydrogénase, triosephosphate isomérase) ou de structure (desmine, CapZ- β et un fragment de myosine lourde chaîne).

IV.7.2. Modifications du protéome dues aux facteurs *post-mortem*

La transformation *post-mortem* du muscle en viande est une étape cruciale pour le développement de nombreux critères de la qualité de la viande (Renand *et al.*, 2001 ; Ouali *et al.*, 2006). Bien que les événements biochimiques qui surviennent dans le muscle après la mort de l'animal soient relativement bien documentés (Ouali, 1990 ; 1991), les outils protéomiques fournissent une vue plus détaillée des voies et processus sous-jacents (D'Allessandro et Zolla, 2013a,b). Bien que le rôle du système protéolytique des calpaïnes ait été largement étudié (Koohmaraie *et al.*, 2002; Koohmaraie et Geesink, 2006), il est admis aujourd'hui que le processus de développement de la qualité de la viande au cours de la période *post-mortem* est le résultat de l'action synergique de plusieurs systèmes protéolytiques endogènes, dont le premier activé est le système des caspases (impliqué dans le phénomène d'apoptose) (Ouali *et al.*, 2006 ; Herrera-Mendez *et al.*, 2006 ; Kemp *et al.*, 2012).

IV.7.2.1. Modifications de l'expression des protéines du muscle lors du stockage

Les modifications *post-mortem* des protéines dans le muscle ont initialement été rapportées par Lametsch *et al.* (2002). Un total de 23 spots ont été séparés par 2DE, et trouvés accumulés dans le muscle stocké pendant 48 h. Parmi eux, 18 spots ont été identifiés par MALDI-TOF, et proviennent de 3 protéines de structure et 6 protéines du métabolisme énergétique (Tableau 03). Le poids moléculaire et la longueur estimée des séquences d'acides aminés de certains spots identifiés indiquent que leurs fragments résultent d'une activité protéolytique dans la viande. Hwang *et al.* (2005) ont également évalué la protéolyse *post-mortem* dans le muscle *Longissimus* du porc en utilisant une approche protéomique similaire, où les temps d'échantillonnage étaient de 0 h (lors de la saignée), 24 h, 3 jours et 7 jours *post-mortem*. Les auteurs ont ainsi révélé la dégradation de 9 peptides d'actine et dont plusieurs d'entre eux corroborent à ceux rapportés par Lametsch *et al.* (2002).

Les modifications de protéines dans le muscle *post-mortem* sous différentes conditions *pré-abattage* et chez différentes races ont également été étudiées. Morzel *et al.* (2004) ont étudié l'influence des conditions *pré-abattage* et du temps de stockage *post-mortem* sur les

modifications du protéome de la viande de porc pendant 72h de maturation. Les abondances de 37 spots protéiques ont été modifiées significativement en fonction du temps d'attendrissage juste après l'abattage jusqu'à 72 h *post-mortem* (Tableau 03). Trois différentes hypothèses de ces changements ont été émises, à savoir la protéolyse, les modifications post-traductionnelles, et la libération de peptides des protéines de structure ou de complexes protéiques. Ils ont également souligné que la période *pré-abattage* n'a eu aucun effet significatif sur les enzymes de protéolyse et par conséquent les événements protéolytiques.

Les modifications *post-mortem* des protéines du muscle bovin ont été rapportées par Jia et ses collaborateurs en 2006. Ils ont étudié les changements d'abondances des protéines du métabolisme du muscle *Longissimus thoracis* dans des biopsies prélevées très tôt après abattage (Jia *et al.*, 2006a). Ils ont identifiés 24 protéines dont l'abondance est modifiée entre 4 jours et 45 - 60 min *post-mortem*. Les résultats obtenus confirment une augmentation du métabolisme énergétique aérobie juste après abattage, pour régénérer les niveaux d'ATP dans le muscle. Dans une étude ultérieure, le même groupe a comparé les profils de modifications des protéines du cytosol des muscles *Longissimus dorsi* et *Semitendinosus* à 0 et 24 h *post-mortem* (Jia *et al.*, 2006b). 5 protéines ont montré des changements dans les deux muscles pendant la durée de stockage. 15 autres modifications ont été observées dans les deux muscles, dont certaines jamais observées auparavant dans le muscle bovin. Enfin, en suivant les modifications en cinétique à six différents temps *post-mortem* entre 1 et 24 h, ils ont identifié des modifications significatives pour un total de 47 spots (Jia *et al.*, 2007). 39 de ces protéines peuvent être classées en 5 groupes : enzymes du métabolisme énergétique, protéines de défense et de stress, protéines de structure, enzymes protéolytiques, et d'autres protéines non identifiées. Visiblement, les enzymes métaboliques identifiées sont toutes associées aux voies de régénération de l'ATP, que ce soit la voie glycolytique ou oxydative. En outre, Morzel *et al.* (2008) ont étudié le protéome du muscle *Longissimus thoracis* de taurillons de la race Blonde d'Aquitaine prélevé à 1 h *post-mortem* et après 14 jours de maturation, et ils ont identifié 14 protéines et fragments qui ont subi des changements importants (Tableau 03).

D'autres études ont été conduites dans le muscle du poisson, les premières études ont été initiées par Morzel *et al.* (2000) chez le saumon atlantique (*Salmo salar*). Jessen et Kjaersgard (2003) ont réalisé une analyse protéomique pour révéler les modifications *post-mortem*, du protéome musculaire de la morue atlantique (*Gadus morhua*). Les auteurs ont observé que 11 spots protéiques changent d'une manière significative durant les 8 jours de stockage. Parmi ces 11 spots, 9 avaient de fortes intensités pendant plusieurs heures; et 8 dès les deux 1ères

heures suivant la mort. En revanche, les 2 autres spots diminuent d'intensité et exprimaient une modification significative après 8 jours. Les auteurs montrent qu'il y a relativement peu de produits de dégradation du muscle de la morue par rapport à celui des mammifères.

IV.7.2.2. Modifications des protéines du muscle *post-mortem* dues aux traitements technologiques

Une multitude de traitements technologiques pour manipuler les carcasses ou les muscles pendant la période *post-mortem* en vue d'optimiser les paramètres de qualité technologique ont été décrits (Thompson, 2002). Par exemple, la stimulation électrique après abattage a reçu une attention toute particulière comme procédure d'amélioration de la qualité de la viande (Swatland, 1981). Le désossage à chaud des muscles de haute valeur marchande augmente aussi d'une manière efficace le potentiel de tendreté (Troy, 2006). Ces exemples d'intervention ont un impact sur les mécanismes biochimiques qui contribuent au résultat final de la qualité. Par conséquent, comprendre les modifications survenant suite aux traitements est une des priorités de nombreux groupes de recherche.

Pour exemple, des analyses protéomiques ont été réalisées pour étudier les changements de protéomes sur des périodes de stockage prolongées. Luccia *et al.* (2005) ont suivi l'évolution du protéome du jambon sec pendant 14 mois d'affinage. Leurs résultats indiquent essentiellement que deux molécules d'actine, la tropomyosine et la MLC disparaissent au cours de la période de maturation et ont été presque complètement hydrolysées après 12 mois. Dans une autre étude, Kjaersgard *et al.* (2006) ont utilisé la 2DE, combinée à la MS/MS, pour étudier les modifications dans les protéines musculaires de la morue pendant la congélation (3, 6, 9, 12 mois). Les résultats indiquent que les poissons congelés entre 3 et 6 mois peuvent être différenciés de ceux congelés pendant 12 mois. Parmi les protéines qui changent, ils ont révélé des fragments d'actine similaires à ceux identifiés chez le porc (Lametsch *et al.*, 2003).

L'intérêt croissant pour améliorer la sécurité sanitaire de la viande tout en préservant sa fraîcheur a incité l'élaboration de nouvelles technologies non thermiques opérant à haute pression. L'application des hautes pressions (HPP : *High-pressure processing*) ou Pascalisation provoque des changements de conformation des protéines, induisant leur dénaturation, agrégation, ou gélification, et peuvent avoir un impact majeur sur la qualité de la viande. Récemment, le groupe de Mullen en Irlande, ont étudié les changements induits par HPP sur le profil des protéines musculaires et les ont reliés aux indicateurs de qualité.

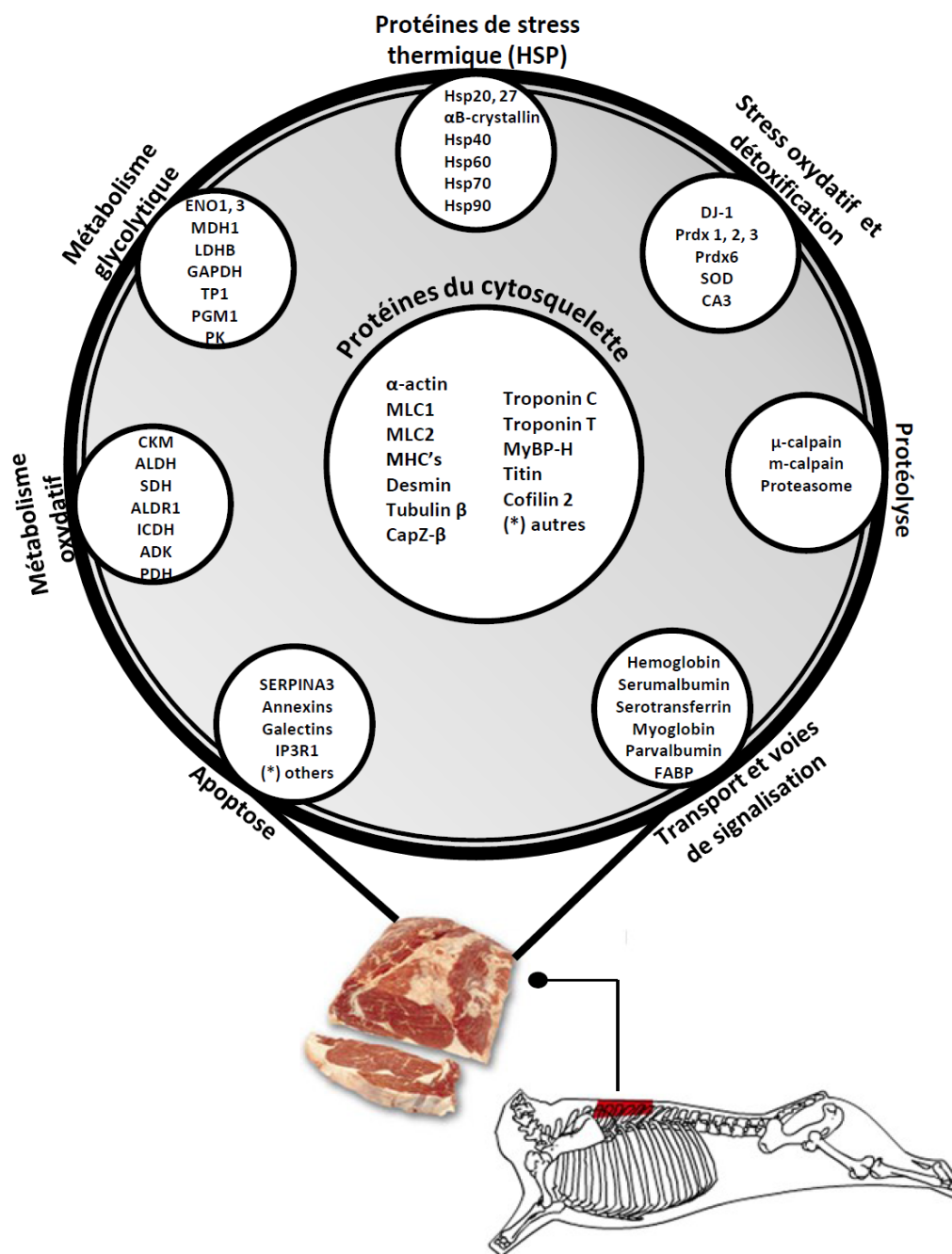


Figure 29. Principales familles biologiques regroupant la liste non exhaustive de biomarqueurs des qualités des viandes identifiés dans les études protéomiques lors des 15 dernières années (Tableau 03).

Dans leurs études sur le muscle long dorsal bovin, le groupe a traité des morceaux de viandes à différentes pressions, de 200 à 600 MPa. Pour exemple, la concentration totale et la solubilité des protéines, la couleur, et la capacité de rétention d'eau ont été trouvées comme étant les paramètres de qualité qui sont le plus affectés par ce traitement technologique. L'analyse protéomique a révélé que l'intensité de nombreux spots protéiques sont modifiés et que les protéines sarcoplasmiques sont les plus touchées par le traitement HPP (Marcos *et al.*, 2010) et (Marcos et Mullen, 2014). Ces travaux ont mis en évidence les mécanismes par lesquels la qualité de la viande est influencée et proposent de futures bases pour l'identification de biomarqueurs qui auront pour but de « manager » les produits transformés.

IV.8. Liste non exhaustive de biomarqueurs de la qualité de la viande identifiés à ce jour

Comme déjà présenté, un des objectifs des recherches sur la viande est de pouvoir expliquer et/ou prédire la variabilité la qualité de la viande, en comparant les signatures moléculaires de groupes d'échantillons musculaires à l'origine de viande de faible (Q^-) et de haut niveau de qualité (Q^+) constitués sur la base d'un critère de Qualité donné (Figure 28). Ceci sous-entend l'identification de biomarqueurs afin de détecter les animaux selon leur potentiel qualité ($PQ^{-/+}$) ou appartenant à une qualité (classe) faible ou supérieure (voir aussi intermédiaire) et susceptibles de fournir une viande de qualité élevée et constante.

Dans la littérature, il existe d'ores et déjà pléthore de protéines biomarqueurs potentiels des qualités des viandes obtenus par les techniques « omiques » et en particulier la protéomique (voir les principales synthèses de : Picard *et al.*, 2010 ; 2011 ; 2012 ; 2015 ; Guillemain *et al.*, 2011 ; Hamill *et al.*, 2012a,b ; Ouali *et al.*, 2013 ; Chaze *et al.*, 2013 ; te Pas *et al.*, 2013 ; Gobert *et al.*, 2014 ; Wu *et al.*, 2015). Ces biomarqueurs ont été obtenus à partir de différents types de modèles d'étude en utilisant différentes stratégies protéomiques (Tableau 02).

Face à l'augmentation importante du nombre de candidats biomarqueurs apparus dans la littérature ces 10 dernières années, il a été tentant d'essayer de les classer pour pouvoir d'y voir plus clair. Dans ce qui suit, l'état de l'art a été fait et une liste non exhaustive de biomarqueurs identifiés à ce jour a été répertoriée (Figure 29, Tableau 03). Ils ont été classés suivant les fonctions biologiques dans lesquelles sont impliqués. Ce travail a été initié pour une revue de synthèse publiée en 2013 (Ouali, Gagaoua *et al.*, 2013) et a été largement élargi et actualisé dans cette partie de thèse et fera l'objet d'une publication sous forme d'un chapitre d'ouvrage (en préparation) d'un livre édité par Elsevier, dans la série sciences des aliments (*Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*).

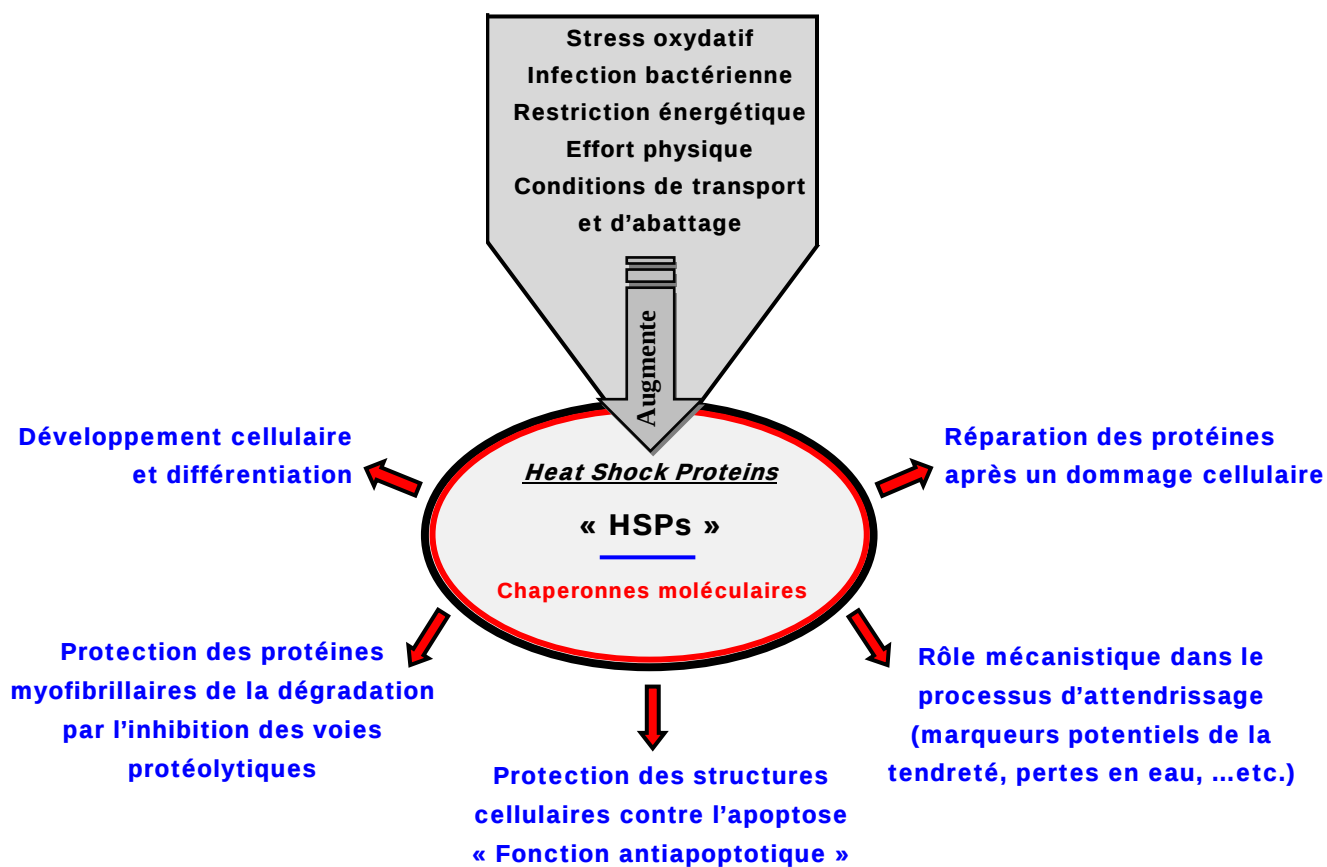


Figure 30. Rôles potentiels des protéines de stress thermique dans le muscle *post-mortem*.

IV.8.1. Biomarqueurs de la famille des protéines de choc thermique

En réponse au stress (Figure 30) : stress oxydatif, infection bactérienne, restriction calorique, conditions de transport et d'abattage ... etc., les cellules produisent rapidement et stimule la production d'une superfamille de protéines connue sous le terme de protéines de choc ou stress thermique ou *Heat Shock Proteins* (HSP) (Garrido *et al.*, 2001 ; Escobedo *et al.*, 2004 ; Ramaglia *et al.*, 2004; Beere, 2005; Selsby *et al.*, 2005; Murlasits *et al.*, 2006 ; Cruzen *et al.*, 2015). Elles sont classées en sous-familles sur la base de leur poids moléculaire: Hsp90, Hsp70, Hsp40, Hsp27, Hsp20, ... etc. Les HSPs sont des protéines ubiquitaires qui sont synthétisées en réponse à des contraintes physiques, chimiques ou biologiques (Li *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007; Morzel *et al.*, 2008; Bao *et al.*, 2008 ; Carlson *et al.*, 2015).

Les protéines de choc thermique ont de nombreux rôles essentiels et ceux qui ont été rapportés dans le muscle sont illustrés dans la Figure 30. Par exemple, elles contribuent à la bonne conformation des protéines et la préservation de leurs fonctions biologiques. La plupart d'entre elles jouent un rôle important comme chaperonnes moléculaires lors de l'assemblage des protéines (Haslbeck *et al.*, 2005), le repliement et dépliage des protéines nouvellement synthétisées (Zietkiewicz *et al.*, 2004), et la renaturation des protéines endommagées (Marques *et al.*, 2006). Ces protéines ont donc le potentiel de protéger les organites et structures intracellulaires des risques associés à la perte de fonctions.

L'hypothèse de l'implication des protéines de stress thermique (HSPs) dans le processus de transformation du muscle en viande a été émise pour la première fois par Ouali *et al.* (2006), et ce en raison de leurs fonctions anti-apoptotiques. Il a été suggéré que ces protéines pourraient être recrutées pour entraver la mise en place du phénomène d'apoptose afin d'empêcher tout danger de mort cellulaire. L'action antiapoptotique débute par la formation d'un complexe avec les caspases actives et par conséquent un ralentissement du processus de mort cellulaire induisant ainsi une perturbation du processus d'attendrissage (Gotoh *et al.*, 2004). Voss *et al.* (2007) ont rapporté que dans les monocytes, certaines HSPs régulent le phénomène d'apoptose par l'inhibition de l'activité protéolytique de la caspase 3. D'autres auteurs ont montré que les HSPs agissent par la séquestration du Cytochrome c après sa libération des mitochondries (Bruey *et al.*, 2000). De ceci, il ressort que l'hypothèse du phénomène d'apoptose comme étant la première étape d'attendrissage, apporte quelques éléments de réponses à la nature de la relation entre le stress des animaux et la variabilité de l'attendrissage de la viande (Ouali *et al.*, 2006 ; Kemp *et al.*, 2012 ; Hollung *et al.*, 2014).

Tous les travaux de recherche les marqueurs biologiques de la tendreté ou d'autres qualités des viandes par génomique fonctionnelle, au niveau ARNm ou protéines, ont souvent révélé un rôle important des *heat shock proteins*, par la sous- ou surexpression dans les muscles *post-mortem* du porc (Hwang *et al.*, 2005 ; Sayd *et al.*, 2006), du bovin (Bouley *et al.*, 2004 ; Pulford *et al.*, 2008a,b ; Jia *et al.*, 2009), du poulet (Zanetti *et al.*, 2013 ; Liu *et al.*, 2012 ; Phongpa-Ngan *et al.*, 2011) et du poisson (Ling *et al.*, 2009 ; Mohanty *et al.*, 2013 ; 2015). Leur expression augmente juste après l'abattage, probablement en réponse à des signaux de stress cellulaire. Chez le bovin, plusieurs études ont démontré que les HSPs peuvent jouer un rôle prépondérant dans le déterminisme de la tendreté de la viande (Picard *et al.*, 2010; 2015).

Bernard *et al.* (2007) ont trouvé une relation négative entre la tendreté et la protéine Hsp40 (codée par le gène *DNAJA1*), une protéine retardant le processus de mort cellulaire dans les tissus musculaires. Morzel *et al.* (2008) ont signalé que la protéine Hsp27 est sous-abondante chez les animaux qui ont des notes de tendreté inférieures et elle a été proposée comme un marqueur potentiel de la tendreté. Dans une autre étude caractérisant le protéome des biopsies de muscle bovin prélevées 4 jours avant abattage, une Hsp de la famille des 70 kDa a été trouvée sous-exprimée chez les animaux ayant des scores de tendreté élevés (Jia *et al.*, 2009).

De nombreuses HSPs semblent avoir une abondance variable durant la période *post-mortem*. Les deux petites HSP ont été identifiées dans la plupart des études de protéomique, à savoir Hsp27 et α B-cristalline. Ces deux petites HSP permettent d'éviter les dommages de structures et la dégradation des protéines du muscle face au phénomène d'apoptose, et aussi de protéger les filaments d'actine du cytosquelette et d'autres protéines face à la fragmentation initiée par le stress (Pivovarova *et al.*, 2005 ; Lomiwes *et al.*, 2013 ; 2014a,b). La modulation de ces protéines au cours de la période *post-mortem* chez le bovin, suggère un changement dans la stabilité *post-mortem* des protéines myofibrillaires (Jia *et al.*, 2007; Laville *et al.*, 2009a,b; Bjarnadóttir *et al.*, 2010).

Considérant que la tendreté de la viande dépend de la dégradation *post-mortem* des protéines myofibrillaires, les petites HSP ont donc été impliquées dans le déterminisme de la tendreté. De ce fait, Hsp27 a été proposée comme candidat dans la liste des biomarqueurs vu la relation étroite entre sa surexpression et les notes de tendreté (positivement corrélée avec la force de cisaillement de Warner-Bratzler (WBSF)) (Kim *et al.*, 2008).

La protéine α B-cristalline empêche la précipitation des protéines dénaturées et augmente la résistance au stress cellulaire (Augusteyn, 2004). De plus, il a été montré que l'expression de Hsp20 et α B-cristalline augmente d'une manière considérable durant les premières heures qui suivent l'abattage chez le bovin dans le muscle *Longissimus* et diminue par la suite dans les extraits protéiques totaux (Pulford *et al.*, 2008). D'autre part, il a été suggéré que les modifications d'abondance de Hsp20 peuvent conduire à une diminution de la stabilité des filaments d'actine, qui peut être associée à une augmentation des notes de la tendreté de la viande (Zapata *et al.*, 2009).

Comme abordé ci-dessus, Bernard *et al.* (2007) ont montré que l'expression du gène *DNAJA1* codant pour la protéine Hsp40, est un bon prédicteur de la dureté de la viande de taurillons de la race Charolaise. Un résultat similaire a été rapporté récemment par Sami *et al.* (2015). Bernard *et al.* (2007) ont constaté que la protéine est sous-exprimée dans les échantillons de muscle de la viande de qualité supérieure et son expression est inversement liée avec les notes de tendreté. La protéine Hsp40, est une co-chaperone de Hsp70, et ce complexe peut inhiber d'une manière directe l'apoptose par la prévention de la translocation de la protéine proapoptotique Bax vers la membrane mitochondriale, qui déclenche la libération du cytochrome c, et initie l'activation de la voie intrinsèque et de la caspase 9 (Gotoh *et al.*, 2004). Les auteurs ont montré que l'expression de *DNAJA1* était corrélée négativement à la tendreté mesurée après 14 jours de maturation et explique à elle seule 63% de la variabilité de la tendreté sensorielle. D'autre part, les niveaux d'expression de la protéine Hsp70 ainsi que deux spots correspondant à Hsp27, ont également été trouvés faiblement abondantes dans le muscle LT de taurillons de la race rouge Norvégienne et ce après 48 h *post-mortem* (Bjarnadottir *et al.*, 2010).

En plus de la tendreté de la viande, d'autres études évoquées précédemment ont aussi révélé une forte association entre l'expression des HSP et plusieurs paramètres de la qualité de la viande (Kim *et al.*, 2008). L'expression de l' α B-cristalline, et avec une faible abondance, Hsp27, ont été négativement associés aux valeurs de l'indice de la Luminance (L^*) de la couleur de la viande (Hwang *et al.*, 2005). De fortes pertes en eaux du muscle *Longissimus dorsi* chez le porc ont été trouvées associées à une diminution des concentrations de Hsp27 et α B-cristalline (Kwasiborski *et al.*, 2008a). En relation avec l'augmentation de la température corporelle due au stress, Hsp27 et α B-cristalline ont également été décrites comme marqueurs potentiels des pertes en eaux dans la viande fraîche (Sayd *et al.*, 2006; Laville *et al.*, 2009).

IV.8.2. Biomarqueurs appartenant à la voie du stress oxydatif et détoxification

Des protéines associées à la réponse au stress oxydant, telles que la superoxyde dismutase (SOD1), les peroxyredoxines (1, 2, 3 et 6 : Prdx) ou encore DJ-1 (codée par *PARK7*) ont été révélées comme biomarqueurs des qualités des viandes, notamment de la tendreté dans plusieurs études ([Kwasiborski et al., 2008](#) ; [Jia et al., 2009](#), [Guillemin et al., 2012](#) ; [Polati et al., 2012](#) ; et pour revue [Picard et al., 2012a](#) ; [D'Alessandro et Zolla, 2013a](#)). Chez le bovin, la SOD1 est corrélée positivement avec la mesure de WB (+0,43) au niveau du muscle *Semitendinosus* ([Guillemin et al., 2012](#)). Chez le porc, elle a été trouvée liée aux pertes en poids et en eaux dans le muscle *Longissimus* ([Kwasiborski et al., 2008](#) ; [Te Pas et al., 2013](#)).

Les superoxyde dismutases (SOD) sont des métalloprotéines caractérisées par le métal (cuivre (Cu) et zinc (Zn), manganèse (Mn), fer (Fe) ou nickel (Ni)) contenu dans leur site actif. Les superoxyde dismutases à Cu-Zn constituent une classe distincte des superoxydes dismutases à fer et à manganèse ([Perry et al., 2010](#) ; [Forest et al., 2000](#)). Les SOD, possèdent une activité enzymatique: la catalyse de la dismutation du superoxyde en dioxygène et peroxyde d'hydrogène ([Zelko et al., 2002](#)).

La protéine DJ-1 codée par le gène *PARK7* a été rapportée comme étant le deuxième gène responsable de l'apparition précoce autosomique récessive parkinsonisme ([Bonifati et al., 2003a,b](#) ; [Canet-Avilés et al., 2004](#)). C'est une protéine ubiquitaire de 189 acides aminés et son poids moléculaire est de 20 kDa. DJ-1 est aussi connue sous le nom d'oncogène DJ-1 et comme la protéine 7 de la maladie de Parkinson (*PARK7*). Elle fait partie de la famille des ThiJ/PfpI et possède un site de sumoylation (une MPT aboutissant à la liaison covalente d'une ou plusieurs protéines SUMO sur une lysine acceptrice d'une protéine cible) qui se situe sur la lysine 130 ([Takahashi et al., 2001](#) ; [Shinbo et al., 2005](#)). Le fait qu'elle soit sumoylée, ne prouve en rien que son activité soit optimisée. DJ-1 a été initialement identifiée comme un oncogène ([Nagakubo et al., 1997](#)) et plus tard s'est révélée être une protéine de peroxyde sensible à l'hydrogène, ce qui suggère qu'elle peut fonctionner comme un antioxydant ([Mitsumoto et al., 2001](#)). C'est en tout les cas la seule fonction biologique qui lui a été attribuée concernant la viande. Enfin, bien que DJ-1 ait été identifiée dans plusieurs mécanismes, sa principale fonction demeure néanmoins de contribuer à éliminer ou réduire le stress oxydant à l'intérieur des cellules, en vue de sa capacité d'élimination du peroxyde d'hydrogène, qui est considéré comme une espèce réactive oxygénée provoquant le stress oxydant.

Les peroxyrédoxines (Prdx) sont un ensemble d'enzymes capables de dégrader non seulement le peroxyde d'hydrogène, mais aussi les peroxydes organiques, grâce à leur résidu cystéinyl : ce sont donc des peroxydases (Yamashita *et al.*, 1999). Elles constituent une famille d'enzymes ubiquitaires contrôlant le taux de peroxydes induit par les cytokines et interviennent de ce fait dans les mécanismes de transduction du signal dans les cellules de mammifères (Fisher *et al.*, 2011 ; Immenschuh et Baumgart-Vogt, 2005).

Leur activité peut être régulée par phosphorylation, changement d'état d'oxydoréduction et également par oligomérisation. On distingue deux classes de peroxyrédoxines : i) les peroxyrédoxines 1-Cys et ii) les peroxyrédoxines 2-Cys. Elles partagent le même mécanisme catalytique de base, dans lequel un résidu de cystéine du site actif est oxydé en acide sulfénique –SOH par le peroxyde agissant comme substrat (Claiborne *et al.*, 1999). La distinction entre les deux classes de peroxyrédoxines repose sur la façon dont l'acide sulfénique est réduit en thiol –SH pour redonner le résidu de cystéine. Les enzymes 1-Cys peuvent être réduites en présence d'acide ascorbique ou de glutathion S-transférase, tandis que les peroxyrédoxines 2-Cys le sont par des thiols tels que le glutathion.

Parmi les peroxyrédoxines rapportées pour jouer un rôle important dans le déterminisme de la tendreté de la viande bovine, nous pouvons citer la Prdx6 (Jia *et al.*, 2009). C'est, le 6^{ème} membre de la famille des Prdx à être décrit. Elle partage les propriétés structurales et fonctionnelles avec les autres membres de cette famille mais possède des caractéristiques importantes qui la rend unique parmi les Prdxs (Ouali *et al.*, 2013) par exemple :

- i) ne possède qu'un seul résidu cystéine conservé au lieu de deux pour d'autres membres ;
- ii) la thiorédoxine ne participe pas dans le cycle catalytique par rapport aux autres membres. Le glutathion semble bien être le réducteur physiologique pour Prdx6 ;
- iii) est capable de se lier et de réduire les hydroperoxydes de phospholipides, une activité enzymatique essentielle dans la défense antioxydante ;
- iv) les études structurales ont révélé que Prdx6 est une enzyme bi-fonctionnelle avec l'activité de la phospholipase A2, en plus de sa fonction de peroxydase (Manevich et Fisher, 2005 ; Fisher *et al.*, 2011).

En plus des protéines du stress oxydant, certains biomarqueurs impliqués dans les mécanismes de détoxification des cellules ont été identifiés. Il s'agit en particulier de l'anhydrase carbonique (CA3). La CA3 est une enzyme présente à la surface plasmique intracellulaire capable de catalyser la conversion du CO₂ en bicarbonate (et vice-versa). Son identification dans le muscle *post-mortem* pourrait expliquer, au moins en partie, la discontinuité observée dans les profils de pH chez le bovin (Boudjellal *et al.*, 2008) qui est en accord avec les récents résultats (Ruusuvaori *et Kaila*, 2014) concernant les fonctions biologiques de cette protéine. Dans le cas de la viande, la CA3 a été souvent identifiée en surabondance dans le muscle *post-mortem* bovin (Polati *et al.*, 2012 ; D'Allessandro *et al.*, 2012) et corrélée à la force de cisaillement. Chez le porc, elle a été négativement corrélée aux pertes de poids des carcasses (Kwasiborski *et al.*, 2008b).

En outre, d'autres biomarqueurs comme la lactoylglutathione lyase, ou Glyoxylase 1, capable de catalyser la première étape de la conversion de méthylglyoxal en lactate ont été aussi identifiés (Mullen *et al.*, 2009 ; Polati *et al.*, 2012). Enfin, outre leur fonction dans la glycolyse (Jia *et al.*, 2006), certains membres de la famille de l'aldéhyde déshydrogénase (Vasiliou *et al.*, 2012), pourraient également protéger les cellules contre les effets cytotoxiques de divers aldéhydes qui s'accumulent dans le cytosol (O'Brien *et al.*, 2005).

IV.8.3. Biomarqueurs appartenant au métabolisme énergétique

Le métabolisme énergétique musculaire regroupe l'ensemble des réactions qui s'accompagnent de la production d'énergie utilisable par la cellule. Le métabolisme oxydatif correspond à l'oxydation aérobie totale du glucose et des lipides. En revanche, le métabolisme glycolytique correspond à la dégradation anaérobie du glucose ou du glycogène avec fourniture d'ATP et formation de lactate.

IV.8.3.1. Voie énergétique glycolytique

Tous les biomarqueurs identifiés de cette voie métabolique en comparant des groupes d'animaux sur la base d'un paramètre de qualité supérieur ou faible sont des enzymes de la glycolyse (Hocquette *et al.*, 2007 ; Jia *et al.*, 2006b ; Bjarnadottir *et al.*, 2010 ; Chaze *et al.*, 2013). Pour le muscle *Longissimus thoracis* (entrecôte), les protéines représentatives du type rapide glycolytique sont plus abondantes dans les viandes les plus dures. C'est le cas par exemple d'une étude conduite par le groupe de Picard en France (INRA de Theix) ou la phosphoglucomutase, la lactate déshydrogénase-B (LDH-B), la triphosphate isomérase en

racres Charolaise et Salers, la glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase (GAPDH) en race Limousine, des isoformes de Troponine T rapide (TnTr) en races Charolaise et Blonde d'Aquitaine, et de la β -enolase en races Limousine et Blonde d'Aquitaine sont les plus discriminantes des deux classes de tendreté (Chaze *et al.*, 2013).

Globalement, les protéines les plus souvent identifiées sont la GAPDH, la phosphoglycérate kinase (Jia *et al.*, 2006) ; l'énolase (Laville *et al.*, 2009a ; Choi *et al.*, 2010), la pyruvate kinase (Laville *et al.*, 2009a ; Polati, *et al.*, 2012) et la lactate déshydrogénase (Jia *et al.*, 2006b ; Laville *et al.*, 2009a ; Choi *et al.*, 2010 ; Polati *et al.*, 2012). Outre leur rôle énergétique, certaines enzymes glycolytiques comme la GAPDH ont un rôle multifonctionnel. La GAPDH est présente dans les différents compartiments de la cellule et contribue à l'initiation du processus apoptotique, transfert des vésicules entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi et à la pro-survie des cellules en interagissant avec le phénomène d'autophagie (Sirover, 1999 ; Tarze *et al.*, 2007 ; Colell *et al.*, 2007). Par ailleurs, l'aldéhyde déshydrogénase contribue à la glycolyse par la conversion directe du glycéraldéhyde au 2-phosphoglycérate (Jia *et al.*, 2006b). Cette enzyme est un membre de la famille de l'aldéhyde déshydrogénase, qui est connue pour être impliquée dans plusieurs autres processus métaboliques, y compris celui des acides aminés et des acides gras (Vasiliou *et al.*, 2004 ; 2012). Certains membres de cette famille protègent contre les aldéhydes générés par la peroxydation des lipides et contre le stress à la fois oxydatif et osmotique (Pappa *et al.*, 2005 ; Brocker *et al.*, 2010 ; 2011). D'autres protéines ont aussi été révélées intéressantes comme l'isoforme MyHC IIx (rapide glycolytique) qui a été montrée plus abondante dans le *Longissimus thoracis* ayant des notes de tendreté faibles (Picard *et al.*, 2012a,b).

IV.8.3.2. Voie énergétique oxydative

Le métabolisme énergétique oxydatif se situe à l'intérieur de la matrice mitochondriale où les produits de dégradation ultimes de lipides, d'acides aminés et les polysaccharides sont oxydés, afin de fournir des substrats dans la chaîne de transport d'électrons et de l'ATP-synthase responsable de la production d'ATP (Ferrari *et al.*, 1997 ; Ouali *et al.*, 2013). De nombreuses protéines de cette voie ont été identifiées comme la 3-hydroxyisobutyrate déshydrogénase, un membre du cycle de Krebs (TCA) (Jia *et al.*, 2007) ; la B-hydroxyacyl CoA déshydrogénase (HADH), un membre de la β -oxydation des lipides, aussi connu comme le cycle de Lynen qui produit l'acétyl CoA (Hamill *et al.*, 2012a,b ; Polati *et al.*, 2012) ; le Cytochrome C, un autre membre de la chaîne de transport d'électrons situé à l'extérieur de la

membrane interne de la mitochondrie (Ding *et al.*, 2002) ; la succinate déshydrogénase, une oxydoréductase située sur la membrane interne des mitochondries (Morzel *et al.*, 2008), l'isocitrate déshydrogénase, une enzyme catalysant la décarboxylation de l'isocitrate en α -cétoglutarate (Krell *et al.*, 2011 ; Kwasiborski *et al.*, 2008 ; Te Pas *et al.*, 2013), l'aldéhyde déshydrogénase, une enzyme responsable de l'oxydation des aldéhydes en acides carboxyliques (Laville *et al.*, 2007 ; Kwasiborski *et al.*, 2008b ; Gong *et al.*, 2013) et qui sont toutes des membres du cycle de Krebs (Kim *et al.*, 2009 ; Hamill *et al.*, 2012a,b ; D'Alessandro et Zolla, 2013b).

Une autre enzyme d'une importance capitale et souvent identifiée dans les études de protéomique comme étant liée à plusieurs paramètres de qualité et chez plusieurs espèces, est la Créatine kinase musculaire (CKM) (van de Wiel et Zhang, 2007 ; Kwasiborski *et al.*, 2008 ; Zapata *et al.*, 2009 ; D'Alessandro *et al.*, 2011 ; Bjarnadottir *et al.*, 2012 ; Polati *et al.*, 2012 ; Joseph *et al.*, 2012 ; Di Luca *et al.*, 2013a,b). La CKM a pour fonction de catalyser la conversion de la créatine en phosphocréatine, impliquant la conversion de l'ATP en ADP. Dans une myofibrille, au début d'un stress ou effort musculaire, la concentration de l'ADP augmente rapidement et celle de l'ATP diminue parallèlement, engendrant un déplacement de l'équilibre de la réaction et par conséquent, la CKM catalyse la réaction inverse, permettant ainsi de régénérer l'ATP (Hornemann *et al.*, 2000 ; 2003 ; Lourenço dos Santos *et al.*, 2015).

IV.8.4. Biomarqueurs des protéines du cytosquelette et protéolyse

De nombreuses protéines myofibrillaires sont dégradées dans le muscle *post-mortem* au cours du stockage et leur dégradation contribue certainement à l'attendrissage de la viande. Le détachement *post-mortem* rapide de la lame basale de la membrane plasmique suite à la dégradation de tout lien transversal entre les cellules musculaires et la matrice extracellulaire est l'un des premiers changements de structure résultant de l'hydrolyse des protéines du cytosquelette par les différents systèmes protéolytiques endogènes au muscle (Nishimura *et al.*, 1996 ; Taylor *et al.*, 1997 ; Becila *et al.*, 2010 ; Ouali *et al.*, 2013). Trois systèmes enzymatiques majeurs sont susceptibles d'intervenir : les calpaïnes, les cathepsines et le protéasome (Sentandreu *et al.*, 2002 ; Ahmed *et al.*, 2015 ; Kemp *et al.*, 2010 ; Kemp et Parr, 2012). On évoque aussi depuis peu comme décrit dans la partie II.3 l'intervention des systèmes enzymatiques impliqués dans l'apoptose, les caspases (Sentandreu *et al.*, 2002 ; Herrera-Mendez *et al.*, 2006 ; Ouali *et al.*, 2006 ; 2007 ; 2013 ; Gagaoua *et al.*, 2012). Ainsi, la dégradation de certaines protéines myofibrillaires et cytosquelettiques, telles que la titine

(Fritz et Greaser, 1991), la nébuline (Taylor *et al.*, 1995; Huff-Lonergan *et al.*, 1995), la desmine (Koochmaraie *et al.*, 1991) et la troponine T (Ho *et al.*, 1994) au cours de la maturation de la viande est largement acceptée.

L'utilisation de l'analyse protéomique a apporté de nouvelles informations sur les phénomènes protéolytiques. Dans la plupart des études entreprises, la présence de fragments a été observée dès les premiers prélèvements *post-mortem*. Des protéines de structure telles que l'actine- α , la myosin binding protein H (MyBP-H) et la CapZ- β (protéine de liaison à l'actine) apparaissent discriminantes entre lots de tendreté sensorielle ou mécanique, mais aussi des autres paramètres de qualité. En particulier, l'actine- α a été retrouvée plus abondante dans les lots de tendreté supérieure dans toutes les études réalisées à l'INRA de Theix (France) dans différentes races bovines (Bouley *et al.*, 2004 ; Chaze *et al.*, 2009 ; Hocquette *et al.*, 2007 ; Morzel *et al.*, 2008 ; Picard *et al.*, 2013 ; 2014 ; Gagaoua *et al.*, 2015c) et dans d'autres études menées par d'autres équipes (Lametsch *et al.*, 2003 ; Hwang *et al.*, 2005 ; Zapata *et al.*, 2009 ; Bjarnadottir *et al.*, 2012 ; Polati *et al.*, 2012). Cette protéine de structure (impliquée dans l'apoptose est discutée dans la partie II. 5.1) subit des modifications au cours de la phase de maturation *post-mortem* suite à son clivage par les systèmes protéolytiques, en particulier par les caspases exécutrices (Mashima *et al.*, 1999 ; Rodrigues-Frometa *et al.*, 2013 ; Kinane *et al.*, 2012 ; Gourlay et Ayscough, 2005a,b ; Rasolofoharitseheno *et al.*, 2015). Le fait qu'elle apparaisse comme un bon biomarqueur de plusieurs paramètres de la qualité de la viande dans plusieurs situations, semble donc cohérent. Par exemple, l'abondance de l'actine- α a été trouvée corrélée positivement avec la tendreté dans les trois principales races à viande française : la Charolaise, la Limousine et la Blonde d'Aquitaine (Chaze *et al.*, 2009).

Par ailleurs, une étude menée par Jia *et al.* (2006a) montre une diminution *post-mortem* de la cofiline (une protéine déstabilisant l'actine et appartenant à la famille des ADF : *Actin Depolymerization Factor*, (Galkin *et al.*, 2011)) au sein des deux muscles ST et LT. Cette protéine impliquée dans la polymérisation de l'actine, chute plus rapidement dans le muscle ST moins tendre. Elle a aussi été identifiée dans les études de (Hwang *et al.*, 2005) et (Kwasiborski *et al.*, 2008a) comme étant liée à la force de cisaillement et aux pertes en eau chez le porc, respectivement. C'est une protéine aux fonctions multiples (Bamburg, 2008 ; Wang *et al.*, 2007) et son rôle dans la transformation *post-mortem* du muscle en viande n'est pas encore complètement élucidé.

D'autres protéines de structure comme la Myosin light Chain (MLC I et II) (Bjarnadottir *et al.*, 2012 ; Jia *et al.*, 2009 ; Polati *et al.*, 2012) ; les chaînes lourdes de myosines (Lametsch *et al.*, 2003 ; Zapata *et al.*, 2009 ; Guillemain *et al.*, 2011 ; Polati *et al.*, 2012) ; la desmine (Zapata *et al.* 2009 ; Guillemain *et al.* 2011 ; van de Wiel & Zhang 2007) et la troponine T (TnT) (Hwang *et al.*, 2005 ; Polati *et al.*, 2012 ; Kwasiborski *et al.*, 2008) ou leur fragments ont été aussi souvent identifiées. Par exemple, Muroya *et al.* (2007) ont étudié les variations *post-mortem* de la TnT dans le muscle *Longissimus* bovin par une approche protéomique et plus de 10 spots d'isoformes de TnT (pI 5,7 > 9,6) et 2 spots de TnT lentes (pI 5,6 – 5,7) ont été identifiées après 14 jours de maturation. Les dégradations étaient spécifiques pour chaque isoforme et les auteurs suggèrent l'utilisation des TnT à caractère basique comme des indicateurs pour la gestion de la durée de la maturation de la viande.

IV.8.5. Biomarqueurs impliqués dans les voies de transport, de signalisation et d'apoptose

Plusieurs protéines impliquées dans le transport et le métabolisme du calcium ont été identifiées comme marqueurs de la tendreté. Par exemple, la glycoprotéine du réticulum sarcoplasmique 53 kDa (SR53G) est associée au cycle du calcium, et la modification de son expression pourrait être liée à la contraction musculaire et à l'activité des protéases Ca^{2+} dépendantes (Bouley *et al.*, 2004 ; 2005 ; Picard *et al.*, 2005 ; Hocquette *et al.*, 2006). D'autre part, la parvalbumine, impliquée dans le cycle du calcium, est corrélée positivement à la tendreté de la viande dans des races à viandes (Charolaise et Limousine) (Bouley *et al.*, 2004).

Plusieurs membres de la famille des annexines, les annexines A1 et A6 ont été rapportées à jouer un rôle dans la tendreté. L'abondance de ces protéines impliquées dans la régulation du calcium et le phénomène d'apoptose, est fortement modifiée en phase *post-mortem* (Zhao *et al.*, 2012a,b ; Bjarnadottir *et al.*, 2012). En accord avec l'hypothèse de l'apoptose, la galectine-1 a été identifiée comme étant un biomarqueur de tendreté (Bjarnadottir *et al.*, 2012). Kim *et al.* (2008) ont montré que l'inositol 1,4,5-triphosphate receptor 1 (IP3R1), impliqués dans l'activité des canaux calciques, était plus élevé dans les lots de tendreté supérieure. Étant donné le rôle important du calcium au cours de la maturation (Ouali, 1990) et dans le phénomène d'apoptose (Nicotera et Orrenius, 1998 ; Mattson et Chan, 2003 ; Ouali *et al.*, 2013), ces résultats semblent tout à fait cohérents.

D'autres biomarqueurs impliqués dans les voies de signalisation ou de transport et aussi dans la régulation de l'activité des protéases (serpines) ont été identifiés (Tableau 03).

Objectifs du travail de thèse

« Objectifs du travail de thèse »

Les données bibliographiques présentées dans le chapitre de la partie bibliographique montrent clairement que quel que soit le produit alimentaire mis sur le marché, sa qualité est primordiale pour les consommateurs. Par ailleurs, la qualité sensorielle de la viande bovine, en particulier sa tendreté, est souvent jugée irrégulière et décevante, d'où l'insatisfaction des consommateurs. Afin de maîtriser cette variabilité, de nombreux travaux de recherche ont été développés au cours de ces trois dernières décennies pour identifier des marqueurs biologiques ou biomarqueurs, des qualités organoleptiques, en particulier de la tendreté. Ces projets ont permis d'identifier des profils d'expression protéiques différents dans des lots de tendreté extrêmes et d'aboutir à une liste de protéines représentatives de diverses fonctions biologiques, dont l'abondance est corrélée à la tendreté ou d'autres qualités de la viande. D'autres travaux ont montré que l'espèce, le type génétique, l'âge, le sexe, le type de muscle et l'état de stress de l'animal à l'abattage, influencent le métabolisme musculaire *post-mortem* et les qualités des viandes. Au final, l'ensemble de ces facteurs peuvent induire une forte variabilité de la qualité de la viande. Face à ceci, le consommateur reste insatisfait vis-à-vis de cette variabilité non maîtrisée. Pour résoudre ce problème, il est imminent de mettre en place tous les outils prédictifs nécessaires à l'appréciation des qualités des viandes.

Toutefois, pour être en mesure de mettre en place ces outils en Algérie et comprendre par des techniques innovantes les qualités des produits animaux d'origine Algérienne, une maîtrise de ces techniques s'impose. Cette maîtrise n'est possible qu'en collaborant avec des laboratoires de recherche étrangers pour effectuer des transferts de technologies. Dans ce contexte, une convention a été engagée dans le cadre de ma thèse entre l'institut de l'INATAA de l'université Frères Mentouri Constantine et l'Unité Mixte de Recherches sur les Herbivores de l'INRA Theix en France. L'objectif est de permettre le transfert des techniques et outils permettant aux chercheurs Algériens de développer sur place des recherches de haut niveau, notamment en stratégie « omique », sur les qualités des viandes.

Ainsi, mon projet de thèse, a pour objectif de mieux comprendre l'origine de la variabilité des qualités des viandes par une approche mécanistique. Il se décline en différentes actions allant des analyses sensorielles jusqu'aux mécanismes impliqués en utilisant les caractéristiques musculaires et en particulier les biomarqueurs (Figure 31) :

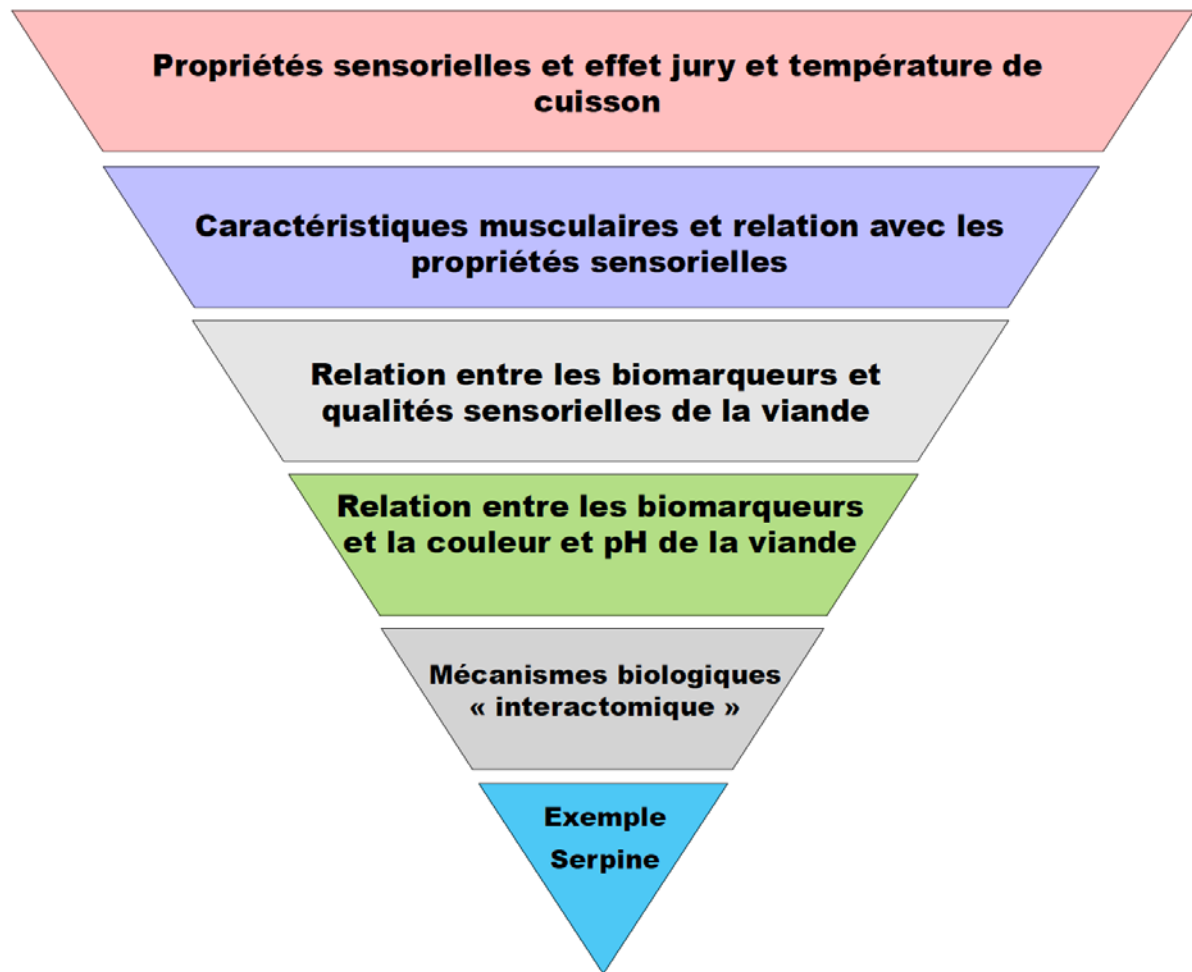


Figure 31. Les différents volets de la thèse : de l'analyse sensorielle aux mécanismes biologiques impliqués dans les qualités de la viande.

i. Valider la relation entre les caractéristiques du muscle et la qualité sensorielle de la viande chez plusieurs races bovines (8 races / 3 types d'animaux) en fonction de différents systèmes de production ;

ii. Compléter et valider la liste des biomarqueurs de la tendreté de la viande et d'autres qualités sensorielles. Une attention particulière est portée aux protéines (exemple : de stress thermique) jouant un rôle important dans le processus d'apoptose récemment proposée ([Ouali et al., 2006](#)) comme étant la première étape de transformation du muscle *post-mortem* en viande ;

iii. Tester la possibilité d'utiliser les analyses bi- et multivariées pour 1) expliquer et/ou prédire les qualités sensorielles de la viande bovine, et 2) se focaliser sur les relations robustes pour décrire et proposer les mécanismes biologiques qui se mettent en place dès la mort de l'animal et impliqués dans le développement de la qualité finale de la viande ;

iv. Tenter à travers une approche mécanistique mettant à profit les nouvelles stratégies « omique », de comprendre les mécanismes biologiques sous-jacents qui régissent le déterminisme des qualités des viandes, en particulier la chute du pH, la couleur et/ou la tendreté ;

v. Elaborer des équations de prédiction du pH, des indices de couleur, des notes de tendreté et autres attributs sensoriels, de la force de cisaillement, et l'indice synthétique de tendreté par les caractéristiques musculaires, et plus particulièrement en utilisant une liste de 21 biomarqueurs mis en évidence dans les études précédentes ([Guillemin et al., 2011a,b](#)).

Méthodologie et dispositif expérimental

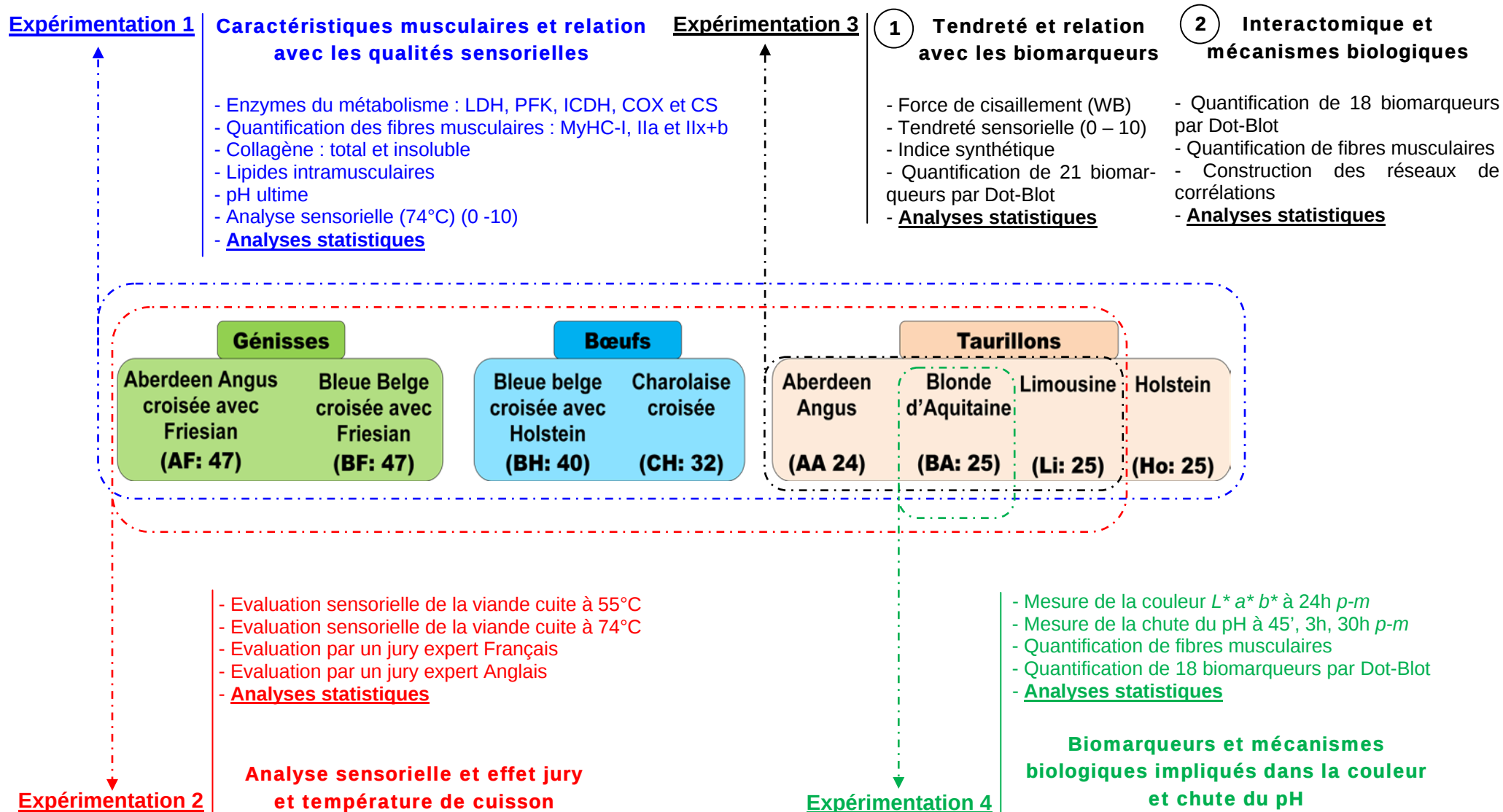


Figure 32. Schéma récapitulatif du dispositif expérimental. Le schéma illustre les différentes parties de la thèse et les types d'animaux utilisés.

« Méthodologie et dispositif expérimental »

I. Dispositif expérimental

Les expérimentations réalisées (Figure 32) ont pour support le projet ProSafeBeef (www.prosafebeef.eu) qui portant sur 265 animaux d'âge moyen comparable de 8 races bovines :

- Ξ **des génisses** : 47 croisées Bleue-Belge x Friesian (BF) et 47 Aberdeen Angus x Friesian (AF) élevées en Irlande ;
- Ξ **des bœufs** : 40 croisés Bleue-Belge x Holstein (BH) et 32 Charolais (CHx) élevés en Angleterre ; et
- Ξ **des taurillons** : de races pures, 25 Limousine (Li), 25 Blonde d'Aquitaine (BA) et 24 Aberdeen Angus (AA) élevés en France (FR) et 25 Holstein (Ho) élevés en Allemagne.

Ma thèse s'est focalisée principalement sur le dernier groupe d'animaux à savoir les taurillons (expérimentations 3 et 4) engraisés au domaine expérimental de l'URH sur le Centre INRA Auvergne-Rhône-Alpes de Theix à Clermont-Ferrand. Néanmoins, pour d'une part, situer ces taurillons en comparaison à d'autres types d'animaux et vérifier l'impact des caractéristiques musculaires sur les propriétés sensorielles de la viande bovine, et d'autre part, déceler la relation entre les attributs sensoriels d'une même viande cuite à deux températures, les expérimentations 1 et 2 portant sur les génisses et les bœufs ont été aussi considérées. Ces deux expérimentations m'ont permis de caractériser et de situer les propriétés de la viande de taurillons élevés au domaine de l'INRA (unité expérimentale UERT). De plus, elles ont permis d'évaluer la qualité de leur viande par rapport aux autres types d'animaux afin d'envisager une étude « -omique » visant à mettre en place des outils prédictifs basés sur l'utilisation des biomarqueurs.

L'ensemble des expérimentations ont été composées d'une période pré-expérimentale de 2 mois, suivie par une période d'adaptation de 3 semaines et par la période expérimentale de finition de 14 semaines, soit 100 jours de finition précédant l'abattage. Dans la Figure 33 est illustré pour exemple le schéma expérimental concernant les taurillons élevés en France des races Aberdeen Angus, Limousine et Blonde d'Aquitaine. Le choix de ces trois races a reposé sur le fait que les animaux présentent des caractéristiques zootechniques différentes.

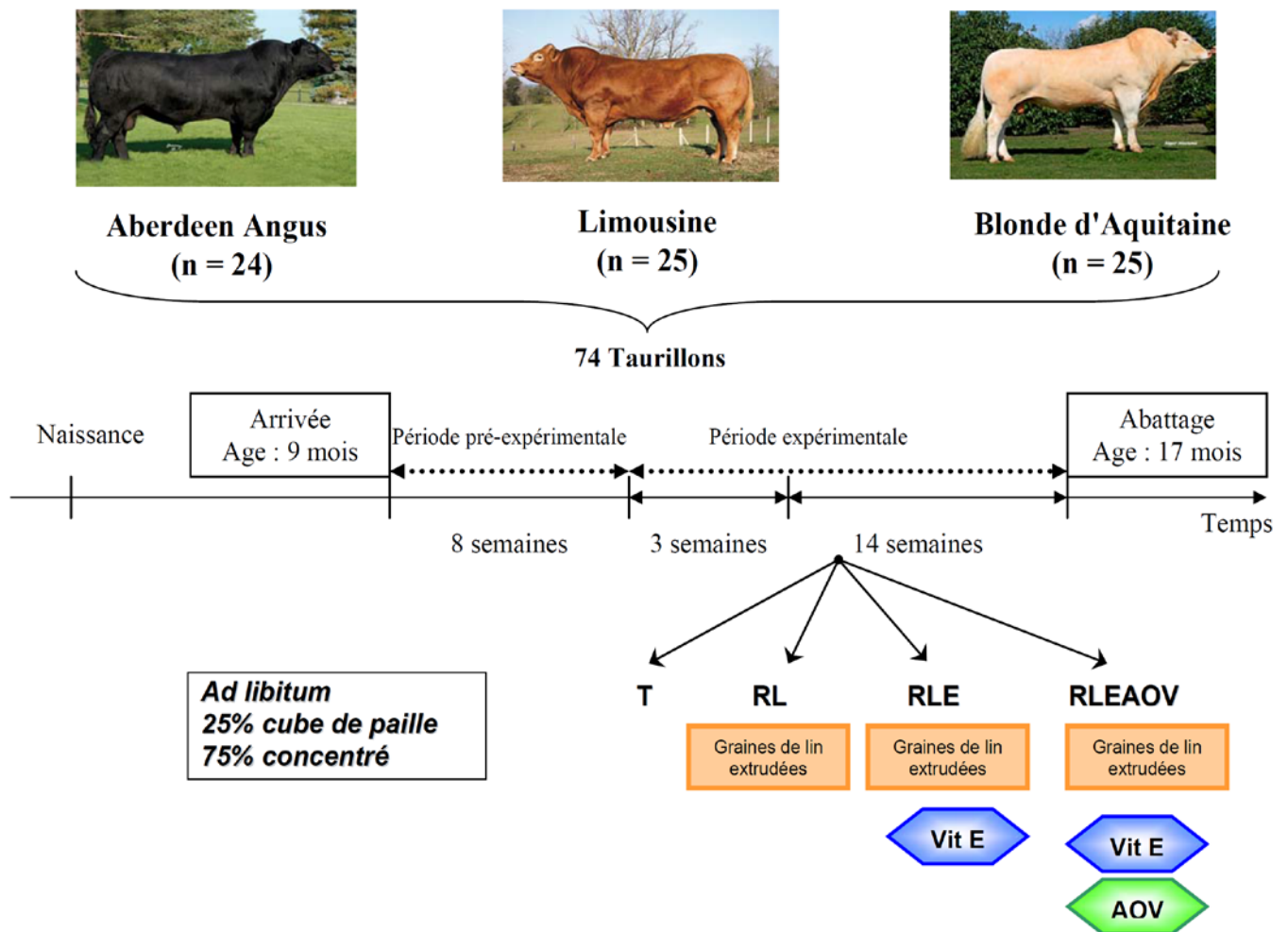


Figure 33. Schéma du dispositif expérimental des taurillons. Il s'agit de 74 animaux élevés en France sur les quels s'est focalisé en sa grande partie mon projet de thèse.

Les trois races diffèrent par leur précocité, les Aberdeen Angus se caractérisent par une tendance à déposer très tôt du gras pour un faible poids de muscle. A l'inverse, les animaux Blonds d'Aquitaine ont une maturité tardive et se caractérisent par une forte musculature et peu de dépôts adipeux. Les animaux Limousins ont des caractéristiques intermédiaires et comparables aux Blonds d'Aquitaine, mais leur musculature est légèrement moins développée.

Les animaux ont été conduits en stabulation avec portillon (4 animaux du même génotype par case), nourris individuellement (75% de concentré et 25% de paille) et pesés toutes les deux semaines. La formulation de la ration distribuée durant la période pré-expérimentale se base sur l'adéquation entre les besoins physiologiques (entretien et croissance) des animaux et les apports alimentaires de la ration (énergétique et protéique). Le régime d'engraissement de cette période était sans supplément lipidique.

Les animaux ont été abattus au même âge (en moyenne 17 mois) et pour un poids vif final presque identique (665 kg en moyenne) (Tableau 02). Les abattages ont été planifiés de façon à ce que les animaux les plus âgés soient abattus les premiers, case par case. Les quatre régimes expérimentaux étaient ainsi représentés à chaque abattage et pour l'ensemble des types d'animaux. Ils ont été abattus à l'abattoir expérimental de l'INRA de Clermont-Ferrand/Theix (unité expérimentale UERT). Les carcasses n'ont pas été stimulées électriquement et ont été stockées à +4°C et de façon à éviter le phénomène de « *cold shortening* ».

II. Prélèvements des muscles

Les prélèvements sur la carcasse sont effectués dans l'heure après l'abattage pour les analyses biochimiques (fibres et isoformes de myosine, enzymes du métabolisme, biomarqueurs et pH 45min *post-mortem*) et 24 heures après l'abattage pour le dosage du collagène, des lipides intramusculaires, la couleur et l'analyse sensorielle et la mesure instrumentale de la force de cisaillement de Warner-Bratzler. Après abattage, les carcasses ont été mises à réfrigérer à +2°C jusqu'à 24h *post-mortem*. Les conditions de prélèvement et de stockage des échantillons sont illustrées dans le Tableau 02 et un descriptif de la distribution des échantillons est schématisé dans la Figure 34. Globalement, c'est le muscle ***Longissimus thoracis*** (LT, entrecôte), un muscle rapide aux propriétés métaboliques oxydo-glycolytiques, qui a fait l'objet de cette thèse. C'est un muscle large de forme ronde situé à l'extrémité vertébrale des côtes. Le muscle LT est délicat à prélever juste après l'abattage mais il est

Tableau 04. Conditions de prélèvement et de conservation des échantillons.

Analyses	Evaluation sensorielle	Cisaillement	Enzymes du métabolisme	Fibres musculaires	Biomarqueurs	Couleur	Collagène et lipides	pH <i>post-mortem</i>			
Conditions											
Temps de prélèvement après abattage (<i>post-mortem</i>)	24 h	24 h	30 – 45 min			24 h	24 h	45 min	3h	24h	30h
Durée de maturation	14 jours à +4°C sous vide	14 j à +4°C	/			/	/	/	/		
Conditionnement	Découpés en steaks et mis sous vide	Mis sous vide	Découpés en miettes			Découpés en steaks	Découpés en miettes	/	Laissés et mesure dans la carcasse		
Congélation/surgélation	Congélation à -20°C	Surgélation 30 min à -30°C	Congélation dans l’azote liquide			/	Congélation dans l’azote liquide	/			
Température de conservation	-20°C	-20°C	-80°C			/	-20°C	/			

considéré comme le muscle de référence pour lequel de nombreuses expérimentations scientifiques ont été conduites et les résultats disponibles pour ce dernier dominent la littérature. En plus du muscle LT, le muscle *Semitendinosus* (ST, rond de gîte), un muscle plutôt aux propriétés glycolytiques, a été aussi prélevé et étudié dans l'expérimentation n° 03 (Figure 32).

Pour les analyses biochimiques, des cubes de viande de 3 à 4 mm de côté ont été plongés directement dans de l'azote liquide pendant 10 à 20 secondes pour la congélation. Une fois complètement congelés ils sont recueillis et mis dans des cryotubes refroidis. Ensuite, les cryotubes remplis sont maintenus dans un dewar contenant de l'azote liquide, jusqu'au rangement dans le congélateur à -80°C .

Pour l'étude du collagène, environ 100 g de muscle ont été prélevés, découpés en morceaux de 1 cm de section transversale, mis sous vide dans des sacs en plastique et stockés à -20°C jusqu'à préparation pour analyses.

Pour la détermination de la teneur en lipides totaux, des échantillons de 60 – 80 g de muscle ont été prélevés, découpés en petits morceaux, broyés finement dans l'azote liquide. La poudre est alors conservée à -20°C jusqu'au jour de l'analyse.

Enfin, pour l'évaluation des qualités mécaniques et sensorielles, 1 cube de 6 cm d'épaisseur a été prélevé pour chaque mesure. Les échantillons ont été mis sous vide et stockés 14 jours à $+4^{\circ}\text{C}$ pour maturation de la viande, puis à -20°C jusqu'au jour de l'analyse.

Il est à signaler que chaque tube ou sachet de prélèvement a été identifié (Nom du muscle ou tissu, type d'analyse, N° et race de l'animal, l'heure et jour de prélèvement).

III. Méthodes

III.1. Évolution du pH *post-mortem*

Pour les mesures du pH, 45min *post-mortem* des biopsies sur la carcasse ont été effectuées. Brièvement, 2 grammes de muscle sont pesés et immédiatement broyés au polytron (PT. MR 2100. Switzerland) à vitesse moyenne de 10 000rpm pendant 15 secondes dans 18 mL d'une solution d'iodoacétate 5 mM et conservé à 4°C . L'acide iodoacétique n'a pas de pouvoir tampon, il bloque l'activité des enzymes glycolytiques qui sont susceptibles d'influencer l'évolution du pH dans le muscle.

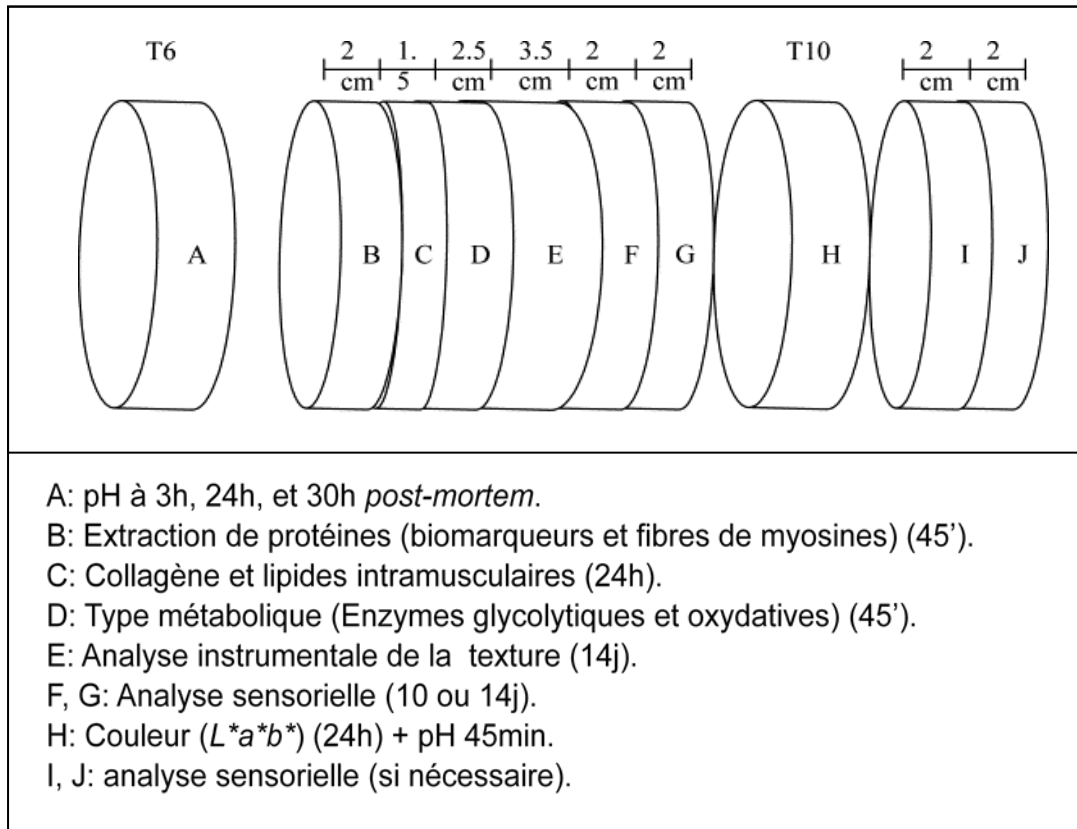


Figure 34. Diagramme illustrant l'échantillonnage du muscle *Longissimus thoracis*.

T6 et T10: sixième et dixième vertèbre thoracique, respectivement

La mesure de pH de l'homogénat est réalisée le lendemain à une température de 6°C avec un pH mètre de type WTW 330i équipé d'une électrode de même marque. La mesure du pH 3h, 24h et 30h *post-mortem*, est réalisée par insertion (~ 2 cm de profondeur) directe d'une électrode à viande (Hanna Instruments, HI9025) dans la masse du muscle de la carcasse (entre la 6^{ème} et 7^{ème} vertèbre) conservé à 4°C. Une moyenne sur cinq points de mesure par muscle a été effectuée.

III.2. Mesure instrumentale de la couleur

À 24 h *post-mortem*, la mesure de couleur est réalisée sur les échantillons de muscle LT conservé à 4°C sous film. La mesure de la couleur a été effectuée sur une surface rafraîchie et exposée à l'air pendant 1 h à 1°C afin de permettre l'oxygénation des pigments. À l'aide d'un emporte-pièce, des rondelles d'une épaisseur minimale de 2,5 cm sont découpées dans la partie supérieure du muscle pour la mesure. Les mesures de couleur sont faites avec un chromamètre de type Minolta CR 300 selon le système CIELAB (Norme CIE, 1976) dont le principe est présenté dans la Figure 18. L'appareil a été utilisé avec un illuminant C, un angle de 0°, une ouverture de mesure de 8mm et calibré sur une plaque blanche ($Y = 93.58$; $x = 0.3150$ et $y = 0.3217$). Le chromamètre fonctionne en mode réflectance : la surface de l'échantillon est éclairée grâce à un récepteur qui capte la lumière réfléchiée, et les valeurs sont enregistrées. Les mesures sont alors basées sur la quantité de lumière réfléchiée par une surface. Chacune d'entre elles réfléchit différentes quantités de lumières à plusieurs niveaux du spectre compris entre 360 et 760 nm. Le colorimètre donne les valeurs des coordonnées trichromatiques L^* , a^* et b^* de l'échantillon. L^* représente la clarté ou luminance (indice de luminosité relatif allant de 0 pour le noir à 100 pour le blanc absolu), a^* représente la composante chromatique rouge-vert ou indice de rouge (rouge quand la valeur est positive et vert quand la valeur est négative) et b^* représente la composante chromatique jaune-bleu ou indice de jaune (jaune quand la valeur est positive et bleu quand la valeur est négative). Pour chaque mesure de couleur, trois répétitions ont été réalisées.

III.3. Etude du type contractile par séparation électrophorétique des isoformes de chaînes lourdes de myosine

Un protocole spécifique d'électrophorèse a été utilisé pour évaluer la proportion des différentes isoformes de chaînes lourdes de myosine (MyHC : Myosin heavy Chains isoforms) au sein des échantillons étudiés. L'électrophorèse a été réalisée par la méthode de Talmadge et Roy (1993) adaptée pour le muscle de bovin par Picard *et al.* (2011).

Ainsi, les échantillons ont été broyés afin d'en extraire les protéines myofibrillaires dans un tampon d'extraction de façon à solubiliser les protéines myofibrillaires. Pour chaque échantillon, environ 100mg de muscle sont broyés à l'aide d'un broyeur homogénéisateur Polytron (20 000 rpm) dans 5mL de tampon d'extraction contenant 0,5 M NaCl, 20 mM Na Pyrophosphate, 50 mM Tris, 1 mM EDTA et 1 mM Dithiothréitol, pendant 10 secondes. L'homogénat est ensuite laissé au repos pendant 10 min et à 4°C avant centrifugation à 5000g pendant 5min à la même température. Enfin, 500µL du surnageant sont prélevés et dilués dans du glycérol (87%) à concentration finale 50% et stockés à -20°C jusqu'aux analyses.

Ensuite, la concentration en protéines de l'échantillon dilué a été déterminée par spectrophotométrie selon la méthode de Bradford ([Bradford, 1976](#)) en utilisant l'albumine du sérum bovin (2mg/mL) comme standard. Avant de lancer l'électrophorèse, les échantillons ont été mixés (le jour de l'analyse) avec un volume égal du tampon de dénaturation contenant 4% SDS (poids/v), 125 mM Tris, pH 6.8, 20% glycérol (poids/v), 10% β-mercaptoéthanol (v/v) et 0.02% pyronin Y (poids/v). Les échantillons ont été par la suite laissés pendant 10 min à température ambiante avant traitement thermique à 70°C pendant 10 minutes.

Afin de pouvoir déposer 5µg de protéines dans chaque puits du gel d'électrophorèse (gel de séparation : T=9,2% et C=1,96% et gel de concentration T=6,2% et C=1,96%), une feuille de calcul a été utilisée et les concentrations adéquates ont été préparées. Après dépôt des protéines dans les puits, les gels sont mis dans la cuve d'électrophorèse, type Mini-Protean II Dual Slab de chez Bio-Rad. Le tampon de migration dans la chambre intérieure est composé de 50 mM Tris-Base, 75 mM glycine et 0,05% SDS ; et le tampon de migration de la chambre extérieure deux fois plus concentré que le premier est additionné de 0,07% de β-mercaptoéthanol.

La cuve est mise sous tension de 70V pendant 30heures à 4°C pour la migration et la séparation des différentes isoformes de MyHC. Un témoin contenant les quatre isoformes : MyHC-I, IIa, IIx et IIb a été ajouté à l'extrémité de chaque gel. Après séparation, le gel est fixé (30% (v/v) éthanol et 5% acide acétique (v/v)) puis coloré au bleu de Coomassie R250 pendant 24h. Les gels ont été par la suite décolorés dans la même solution de fixation jusqu'à la disparition du fond bleu. Une analyse par densitométrie des gels scannés, a été effectuée à l'aide du logiciel Image Quant TL v2007 (Amersham Biosciences/GE Healthcare) pour estimer la proportion de chacune des isoformes de MyHC.

III.4. Dosage du collagène total et insoluble

La mesure des teneurs en collagène total et insoluble a été faite par estimation de la teneur en hydroxyproline (OH-proline) du muscle car cet acide aminé est spécifique au collagène et représente sa molécule majeure (Etherington *et al.*, 1981). Le principe du dosage repose sur l'oxydation de l'hydroxyproline en milieu neutre par la Chloramine T en acide pyrrole-2-carboxylique, qui ensuite réagit avec le pDAB (para-diméthylaminobenzaldéhyde) ou réactif d'Erlich pour donner un composé de couleur rouge-violette, absorbant à 557 nm.

Les échantillons de muscle (environ 100 g) préalablement prélevés et stockés à -20°C ont été broyés au broyeur ménager (robot coupe R2) en évitant la décongélation des échantillons, puis mis à lyophiliser pendant 48 h avant d'être moulus. Les galettes lyophilisées ont été broyées à l'aide d'un moulin à café pour obtenir une poudre de muscle fine et homogène qui a été conservée à +4°C hermétiquement fermée (para-filmés) jusqu'à utilisation.

Pour l'estimation des teneurs en collagène total, 250 mg de poudre de muscle ont été pesés, en triplicates. En parallèle, la mesure de la matière sèche de l'échantillon a été réalisée (dessiccateur Précisa XM60). L'échantillon a été hydrolysé avec 10 mL d'HCl 6N. Les tubes en pyrex, munis de bouchon à vis avec joint téflon, ont été laissés pendant 16h à 110°C. Cette étape permet de libérer l'hydroxyproline du collagène par coupure des liaisons peptidiques.

Pour la mesure du collagène total (méthode de Woessner, 1961), reprise et adaptée par Listrat *et al.* (1999 ; 2004), l'hydrolysate acide a été dilué 5 fois avec de l'HCl 6N, puis traité avec 10 mg de charbon actif pendant 2 min. L'ensemble a ensuite été filtré avant d'être dilué au 1/5^{ème} avec de l'eau distillée (la concentration en HCl doit être de 1,2N). Un millilitre d'échantillon dilué et de standard ont été neutralisés avec 1 mL de NaOH 1,2N, puis oxydés avec 1 mL de chloramine T. L'excès de chloramine T a été éliminé en ajoutant 1 mL d'acide perchlorique 3,15M. A chaque étape, les échantillons sont vortexés pour mélanger les réactifs. Le réactif d'Ehrlich (solution de p-diméthylaminobenzaldéhyde à 20%) a été ajouté, laissé à incuber 20 min à 60°C. La lecture des absorbances a été effectuée à 557 nm au spectrophotomètre (Kontron Uvikon 860). Les résultats issus des 3 pesées ont été moyennés et exprimés en mg /g de la matière sèche en utilisant une courbe étalon (contenant 3,5 à 20mg d'hydroxyproline par litre) réalisée en parallèle du dosage et ce sur la base que la teneur en collagène correspond à 7,14 fois la teneur en OH-proline.

III.5. Extraction et dosage des lipides totaux

L'extraction des lipides a été réalisée selon la méthode de [Folch et al., \(1957\)](#). Environ quatre grammes de poudre de muscle ont été pesées précisément. En parallèle, la mesure de la matière sèche est effectuée à partir de 1,5 g de poudre de muscle frais mis à sécher 48 h à 80°C. Dans un pot de contenance 100 mL spécialement adapté au broyeur (Bosch, modèle BS45), 45 mL de mélange de Folch (mélange de chloroforme et de méthanol selon le ratio 2 volumes/1 volume) et de l'hyflosupercel (environ 1g) (VWR, réf. 240718.365), poudre abrasive facilitant l'extraction des lipides, ont été ajoutés à la poudre de muscle préalablement pesée. L'ensemble est broyé 1 min à 18 000 tours/min, avec 1 à 2 min entre chaque broyage (2 à 3 broyages sont nécessaires pour homogénéiser le tout). Après avoir rincé l'hélice du broyeur avec du mélange de Folch au-dessus du pot de broyage, l'homogénat a été filtré sur entonnoir en verre fritté de porosité n°2 (diamètre 60 mm, contenance 125 mL, verre Duran type 17D). Après une complète filtration, le résidu présent sur l'entonnoir est re-filtré deux fois supplémentaires selon le même protocole. Les trois filtrats ont été versés dans une ampoule à décanter de 250 mL, mélangés avec 150 mL de mélange de Folch et 37 mL de solution aqueuse de NaCl à 0,73%. Le mélange a été laissé au repos la nuit à température ambiante (c'est la phase de décantation). Le lendemain, la phase inférieure qui contient les lipides a été soutirée dans un ballon à ergot de 250 mL, préalablement pesé. La phase supérieure a été redissoute dans 30 mL de phase inférieure de solution de rinçage des phases (solution aqueuse de NaCl à 0,58%). Après agitation vigoureuse, les phases ont été laissées 1h au repos pour se rééquilibrer, puis la phase inférieure a été soutirée dans le même ballon que précédemment. Après deux évaporations pour éliminer le solvant présent avec les lipides, le ballon à ergot contenant les lipides a été pesé et la valeur notée. On obtient ainsi la quantité de lipides contenu dans l'échantillon de départ, exprimée en g/100 g par matière sèche.

III.6. Dosage de l'activité des enzymes du métabolisme glycolytique et oxydatif

Le type métabolique du muscle a été évalué à travers l'activité des enzymes glycolytiques (Phosphofructokinase (PFK) et Lactate déshydrogénase (LDH)) et oxydatives (citrate synthase (CS), cytochrome C oxidase (COX) et isocitrate déshydrogénase (ICDH)) en utilisant le protocole de [Jurie et al. \(2006 ; 2007\)](#). La mesure des activités a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre (Uvikon, Kontron) à la longueur d'onde de 340 nm et à température constante de 25 °C et les activités enzymatiques sont exprimées en μmol de substrat par minute et par gramme de muscle ($\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$). Pour la mesure de l'activité des

enzymes. Environ 200 mg de chaque échantillon de muscle sont broyés dans un tampon d'homogénéisation à l'aide d'un broyeur homogénéisateur Polytron. Ensuite, les échantillons sont centrifugés. Le surnageant (contenant les enzymes solubles et mitochondries) est utilisé pour réaliser les mesures d'activités.

III.6.1. Métabolisme Glycolytique

L'importance du métabolisme glycolytique a été étudiée par la mesure de l'activité enzymatique de LDH selon la méthode d'Ansay (1974) et celle de PFK selon la méthode de Valberg *et al.* (1998).

- a) L'activité de la LDH a été mesurée suivant la diminution de la concentration du NADH par minute. La LDH catalyse la réaction :

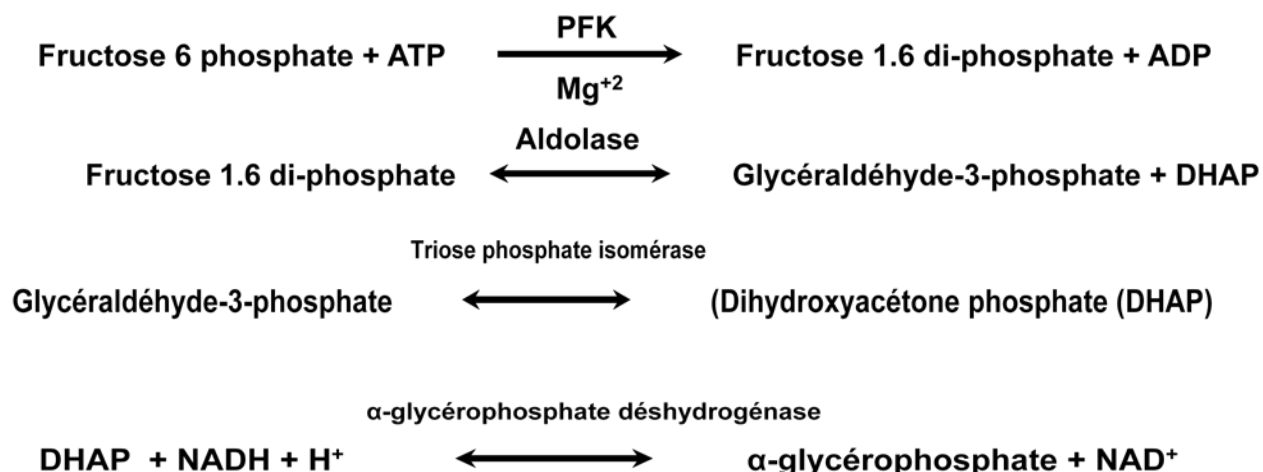


L'activité de l'enzyme est proportionnelle à la disparition du NADH à 340 nm, bande d'absorption caractéristique du NADPH ce qui permet de la déterminer en utilisant la formule suivante :

$$\text{Activité LDH} = \frac{\frac{\Delta DO}{mn} \times \text{vol de la cuve (mL)} \times \text{facteur de dilution} \times \text{vol homogénéisation (mL)}}{\epsilon \times \text{prise d'essai (mL)} \times \text{poids échantillons (g)}}$$

Avec ϵ , le coefficient d'extinction molaire : ϵ 6,3 mL/ μ mol/cm.

- b) La PFK jouant un rôle important dans la régulation de la vitesse de la glycolyse, catalyse la réaction suivante :



Ainsi la disparition du NADH, H^+ à 340 nm est proportionnelle à l'activité de la PFK et permet sa détermination.

III.6.2. Métabolisme oxydatif

Le métabolisme oxydatif du muscle a été mis en évidence par la mesure des activités des enzymes suivantes : ICDH, COX et CS.

- a) L'activité enzymatique de l'ICDH a été mesurée par la méthode de [Briand et al. \(1981\)](#). Elle a été étudiée suivant la rapidité d'apparition du NADPH⁺ puisque l'ICDH catalyse, au sein du cycle de Krebs, la réaction suivante :

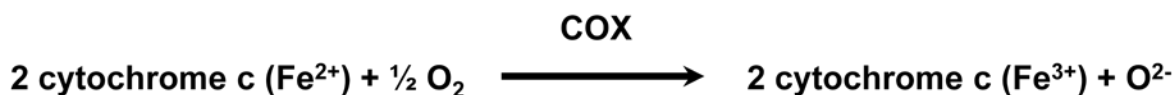


La vitesse de l'augmentation de la densité optique à 340nm traduit la vitesse d'apparition du NADPH. Cette dernière est directement proportionnelle à l'activité de l'enzyme ICDH qui a été calculée par la formule suivante :

$$\text{Activité ICDH} = \frac{\frac{\Delta DO}{mn} \times \text{vol de la cuve (mL)} \times \text{vol homog énéisation (mL)}}{\epsilon \times \text{prise d'essai (mL)} \times \text{poids échantillons (g)}}$$

Avec ϵ , coefficient d'extinction molaire : $\epsilon = 6,3 \text{ mol}/\mu\text{mol}/\text{cm}$.

- b) La Cytochrome c Oxydase (COX) est une enzyme de la chaîne respiratoire des mitochondries, c'est un marqueur de l'activité oxydative des tissus. Elle catalyse la réaction suivante :



L'activité de la COX est mesurée par spectrophotométrie, en suivant la baisse de DO à 550 nm, due à l'oxydation d'une solution de Cytochrome C réduite. Le Cytochrome C, substrat de l'enzyme, doit être réduit. Pour cela, on ajoute un agent réducteur: Solution d'hydrosulfite de sodium. Afin d'éliminer le SO₂ contenu dans le milieu, ce dernier reçoit de l'azote gazeux pendant environ 1H30 min. L'oxydation du cytochrome C est mesurée à 550 nm pendant 2 min.

En fin de réaction, le cytochrome C restant dans la cuve de mesure est complètement oxydé par ajout de quelques grains de ferricyanide de potassium (DO infinie).

La vitesse de la réaction exprimée en $\mu\text{mol de Cytochrome c min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ se calcule en utilisant la formule suivante :

$$\text{Activité COX} = \frac{\ln(DO_{t1} - DO_{\infty}) - \ln(DO_{t2} - DO_{\infty}) \times \text{dilution finale } (=41) \times [S]}{t_2 - t_1}$$

Avec la dilution finale = $(1000 + 25) / 25$ et $[S] = 90 \mu\text{M/mL}$.

- c) La CS, est une enzyme mitochondriale intervenant dans le cycle de Krebs, qui catalyse la réaction suivante :



L'activité CS mesurée par spectrophotométrie, est basée sur le couplage chimique entre les molécules de CoASH, libérées sous l'action de l'enzyme, et le 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DNTB). L'association des deux molécules entraîne la libération de l'ion mercaptide (couleur jaune) qui absorbe à 412 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à l'activité de l'enzyme. On suit l'évolution de la DO pendant 2 minutes, la réaction a été déclenchée par l'addition de 25 μl d'oxaloacétate.

III.7. Evaluation de la qualité sensorielle de la viande

III.7.1. Evaluation sensorielle par un jury entraîné

Pour l'évaluation de l'analyse sensorielle une adaptation du protocole de [Karamichou et al., \(2007\)](#) a eu lieu. Les qualités organoleptiques des différents échantillons de viande ont été évaluées après cuisson à 55°C et/ou à 74°C (températures de cuisson à cœur). Les évaluations sensorielles ont été réalisées en faisant appel à un jury d'analyse sensorielle entraîné (expert).

Pour chaque séance d'analyse sensorielle, le jury était constitué de 12 personnes expertes. A chaque séance, les échantillons d'un même muscle ont été présentés de façon aléatoire et monadique au jury, sur assiette chaude (Figure 35a). Le jury a évalué cinq critères (attributs), sur une échelle continue non bornée (notes allant de 0 à 10 [0 = dur, sec, peu savoureux, très peu appréciable – 10 = tendre, juteux, savoureux, très appréciable]) :

- la tendreté globale : facilité de rupture lors de la mastication
- la jutosité : jus libéré en bouche lors de la mastication
- la flaveur typique : intensité de la flaveur de la viande bovine

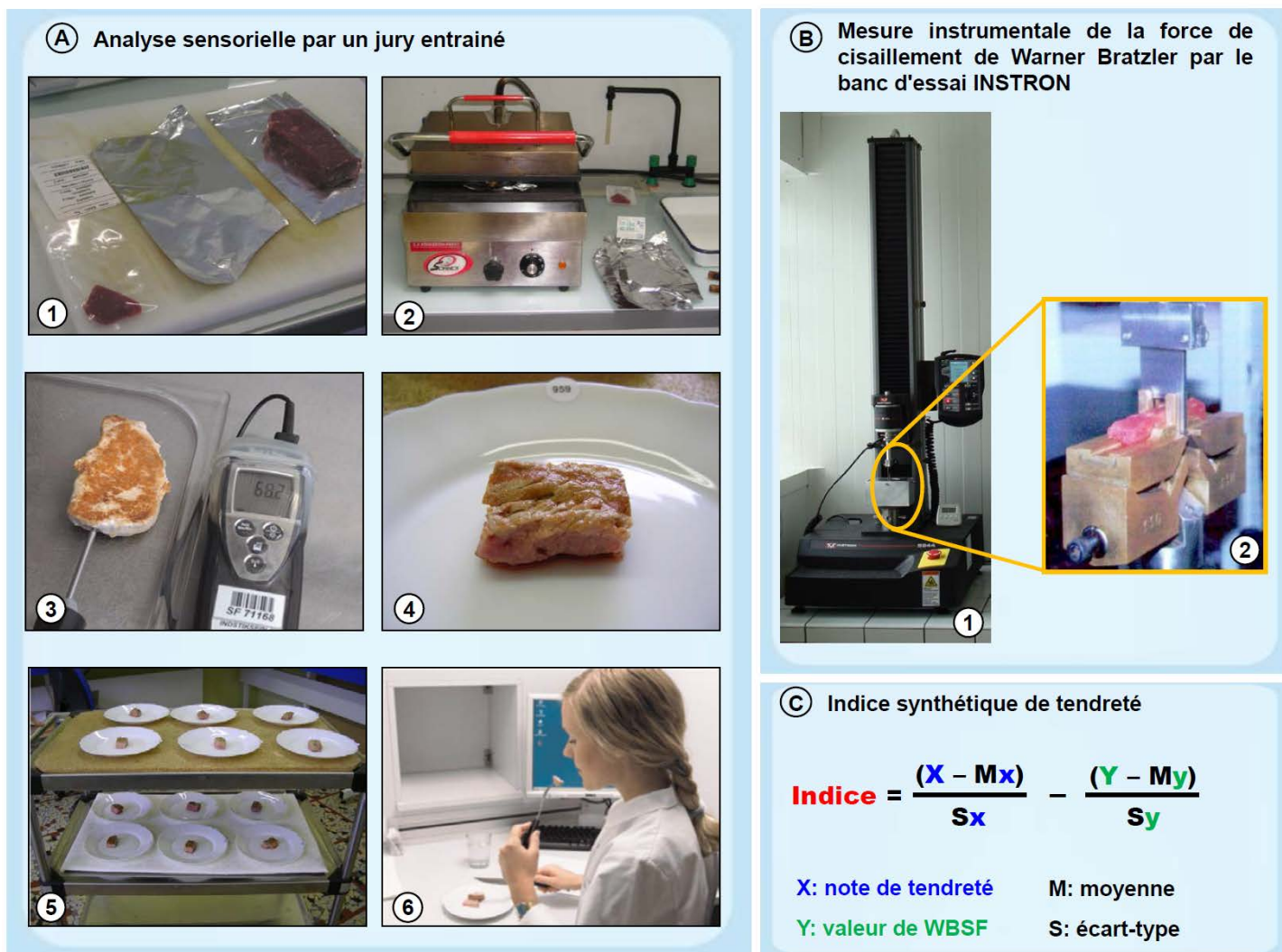


Figure 35. Evaluation sensorielle de la viande.

A) Analyse sensorielle par un jury entraîné (10 à 12 dégustateurs) sur une échelle non-structurée (non bornée) de 0 – 10. Avant que les morceaux de viande soient dégustés, ils sont **(1)** coupés en de petits morceaux et déposés entre deux feuilles d'aluminium, puis **(2)** grillés à la température désirée (55 ou 74°C) sur grill préchauffé 40min à 310°C en surveillant la **(3)** température à cœur du morceau par un thermocouple. Les morceaux de viandes sont par la suite **(4)** codés et **(5)** servis dans des assiettes chaudes et **(6)** présentation aux membres du jury d'analyse sensorielle sur assiette blanche et chaude dans une salle à lumière contrôlée.

B) Banc d'essai INSTRON 5944 avec **(1)** la cellule de cisaillement utilisé pour la mesure de la force de cisaillement (Warner-Bratzler) et **(2)** un zoom sur un morceau de viande dans la cellule.

C) Détermination de l'indice synthétique de la tendreté sur la base des notes de tendreté sensorielle et valeurs de force de cisaillement.

- flaveur anormale : intensité des flaveurs anormales
- l'appréciation globale : évaluation personnelle de l'échantillon dans sa globalité.

III.7.2. Mesure instrumentale de la force de cisaillement de Warner-Bratzler

Pour la mesure mécanique (mesure de la force de cisaillement par Warner-Bratzler) le protocole de [Lepetit et Culioli, \(1994\)](#) a été utilisé. Les mesures mécaniques par Warner-Bratzler ont été réalisées sur des morceaux en cubes de viande cuite de 1 cm² de section transversale et de 1 à 1,5 cm de longueur. Les cubes de viandes (dix au total par échantillon) ont été découpées parallèlement à l'axe des fibres musculaires. Les mesures ont été réalisées à l'aide de l'appareil INSTRON 5944 (Figure 35b). La mesure effectuée nous informe sur la dureté de la viande et est exprimée en N/cm².

Les extrémités des échantillons ont été parées et chaque tranche de 1 à 1,5 cm d'épaisseur a été découpée en nombre de morceaux adéquats pour l'analyse sensorielle ou en dix éprouvettes pour les mesures mécaniques.

Deux jours avant l'analyse, les échantillons ont été mis à décongeler lentement à +4°C. Une heure avant le début de l'analyse, les échantillons (6 cm d'épaisseur) ont été déconditionnés et découpés en tranche de 1 à 1,5 cm d'épaisseur puis déposés dans une assiette afin que la viande se ré-oxygène (environ 50 min).

Le grill a été préchauffé 20 min à 310°C. Les échantillons, préalablement déposés entre deux feuilles d'aluminium, ont été placés sur le grill (Figure 35a, (2)). Lorsque la sonde (sonde de type K) indiquait une température à cœur de 55°C ou 74°C, la cuisson a été arrêtée (ceci pour avoir une dégustation à la température désirée). Le logiciel FIZZ (Fizz v 2.20h, Biosystemes, Couternon, France) a été utilisé pour la saisie des données et leur formatage sous Excel.

Les notes de tendreté d'une part, et les résultats de la force de cisaillement, d'autre part, nous ont permis de calculer un indice synthétique de tendreté ([Chaze et al., 2013](#) ; [Allais et al., 2014](#)) en utilisant la formule indiquée dans la Figure 35c. Cet indice de tendreté prend en compte la corrélation génétique très forte et rapportée liée à la corrélation phénotypique modérée et observée entre les deux caractéristiques mais suggérant que les deux paramètres sont sous le contrôle de gènes communs.

Tableau 05. Liste des 18 biomarqueurs quantifiés en utilisant la technique du Dot-Blot et conditions d'utilisation de chaque anticorps.

Nom du marqueur protéique (gène)	ID UniProtKB	Références des anticorps mono (Mo) ou polyclonaux (Po)	Dilutions des anticorps	Référence (s)
Protéines de stress thermique (Heat Shock Proteins)				
α B-Crystallin (CRYAB)	P02511	Mo. anti-bovine Assay Designs SPA-222	1/500	Bernard et al. (2007)
Hsp20 (HSPB6)	O14558	Mo. anti-human Santa Cruz HSP20-11:SC51955	1/200	Jia et al. (2006)
Hsp27 (HSPB1)	P04792	Mo. anti-human Santa Cruz HSP27 (F-4):SC13132	1/3000	Bernard et al. (2007)
Hsp40 (DNAJA1)	P31689	Mo. anti-human Santa Cruz HSP40-4 (SPM251):SC-56400	1/250	Bernard et al. (2007)
Hsp70-1A/B (HSPA1B)	P08107	Mo. anti-human Abnova HSPA1B (M02), clone 3B7	1/2000	Picard et al. (2010)
Hsp70-8 (HSPA8)	P11142	Mo. anti-bovine Santa Cruz HSC70 (BRM22):SC-59572	1/250	Guillemin et al. (2011)
Hsp70-Grp75 (HSPA9)	P38646	Mo. anti-human RD Systems Clone 419612	1/250	Guillemin et al. (2011)
Métabolisme énergétique				
Enolase 3 (ENO3)	P13929	Mo. anti-human Abnova Eno3 (M01), clone 5D1	1/45000	Lametsch et al. (2003)
LDH-B (LDHB)	P07195	Mo. anti-human Novus LDHB NB110-57160	1/50000	Guillemin et al. (2011)
MDH1 (MDH1)	P40925	Mo. anti-pig Rockland 100-601-145	1/1000	Picard et al. (2010)
Structure				
CapZ- β (CAPZB)	P47756	Mo. anti-human Abnova CAPZB (M03), clone 4H8	1/250	Lametsch et al. (2003)
α -actin (ACTA1)	P68133	Mo. anti-Rabbit Santa Cruz α -actin (5C5):SC-58670	1/1000	Lametsch et al. (2003)
MyLC-1F (MYL1)	P05976	Po. anti-human Abnova MYL1 (A01)	1/1000	Guillemin et al. (2011)
MyBP-H (MYBPH)	Q13203	Mo. anti-human Abnova MYBPH (M01), clone 1F11	1/4000	Guillemin et al. (2011)
Résistance oxydative				
DJ-1 (PARK7)	Q99497	Po. anti-human Santa Cruz DJ-1 (FL-189):SC-32874	1/250	Picard et al. (2010)
Prdx6 (PRDX6)	P30041	Mo. anti-human Abnova PRDX6 (M01), clone 3A10-2A11	1/500	Jia et al. (2009)
SOD1 (SOD1)	P00441	Po. anti-rat Acris SOD1 APO3021PU-N	1/1000	Picard et al. (2010)
Protéolyse				
μ -calpaïn (CAPN1)	P07384	Mo. anti-bovine Alexis μ -calpain 9A4H8D3	1/1000	Morris et al. (2006)

III.8. Quantification des biomarqueurs par Dot-Blot

III.8.1. Extraction des protéines et dosage Bradford

Les échantillons à analyser sont décongelés, puis 80 mg de chacun sont pesés pour extraire les protéines. Il s'agit d'une extraction totale avec des détergents non ioniques selon le protocole décrit par [Bouley et al. \(2004\)](#), qui permet d'extraire le maximum de protéines. Chaque échantillon a été broyé dans un tampon d'extraction contenant : urée 8.3 M, thiourée 2 M, CHAPS 2% et DTT 1%. Les protéines, solubilisées dans le tampon d'extraction, sont dénaturées par l'urée (destruction de la structure spatiale des protéines) et le dithiothréitol (réduction des ponts disulfures). Une centrifugation à 10 000g pendant 30 min et à 8°C nous a permis de séparer la fraction protéique soluble de la fraction solide contenant les acides nucléiques et le collagène.

Chaque échantillon protéique est ensuite dosé par la méthode de Bradford ([Bradford, 1976](#)). Il s'agit d'une méthode de dosage colorimétrique, reposant sur le principe de l'absorbance du Bleu de Coomassie à 595 nm. En effet, le Bleu de Coomassie G250 se lie avec les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et les résidus hydrophobes des acides aminés. L'absorbance à 595 nm d'une solution contenant du Bleu de Coomassie augmente proportionnellement avec la concentration en protéines qu'elle contient. Ainsi, 5 µL d'échantillon, dilués dans 95 µL d'eau, sont mélangés avec 3 mL de solution de Bradford. L'absorbance de la solution est mesurée par un spectrophotomètre, puis rapportée à une gamme étalon constituée de concentrations différentes connues de l'albumine du sérum bovin, servant de référence. Cela permet de déterminer pour chaque échantillon une quantité de protéines en µg / µL. La concentration en protéines des échantillons est ainsi déterminée puis chaque extrait protéique est aliquoté dans plusieurs tubes à raison de 50µL afin d'éviter les nombreux cycles de congélation / décongélation.

III.8.2. Liste des protéines biomarqueurs quantifiées par Dot-Blot

Les différents travaux antérieurs ont permis de proposer une liste de protéines marqueurs potentiels des qualités des viandes ([Picard et al., 2013, 2014 ; 2015 ; Guillemin et al., 2011 ; 2009](#)) et la liste des 18 protéines utilisées dans cette thèse est illustrée dans le Tableau 05. Ces protéines comme présenté dans le chapitre 03 appartiennent à différentes voies métaboliques à savoir : les protéines de structure (Actine, MyBP-H, CapZ-β and MyLC-1F); du métabolisme énergétique (ENO3, LDH-B and MDH1); de la protéolyse (µ-calpain); de la résistance au

stress oxydatif (DJ-1, Prdx6 and SOD1); et des protéines de stress thermique (*Heat shock proteins*) (α B-crystallin, Hsp20, 27, 40, Hsp70-1A/B, 70-8 and 70-Grp75).

III.8.3. Validation de la spécificité des anticorps par Western-Blot

Les anticorps disponibles dans le commerce sont tous certifiés comme étant spécifiques dans leur espèce-cible. La grande majorité de ces anticorps sont dirigés contre l'humain ou la souris, mais rarement le bovin. C'est pourquoi la première étape du travail consiste à s'assurer de la spécificité des anticorps disponibles sur les échantillons de muscle bovin, en utilisant la technique de Western-Blot. Pour cela, un Western-Blot de l'anticorps testé contre des échantillons de muscle bovin permet de vérifier si la taille de la protéine reconnue est conforme à la taille théorique attendue chez le bovin. Cette technique permet également de vérifier la spécificité de l'anticorps, c'est-à-dire si l'anticorps ne reconnaît pas d'autres cibles. Deux techniques de révélation sont disponibles : la chemiluminescence et la fluorescence (Guillemin *et al.*, 2009).

Les échantillons sont dénaturés par ajout d'un volume égal de solution de lyse (glycérol 20 %, Tris 12,5 mM pH 6,8, SDS 4 %, Pyronine Y 10 mg, β -mercaptoéthanol 1,42 M). Les échantillons reposent 10 minutes à température ambiante avant d'être incubés à 60°C pendant 10 minutes. Ensuite, les échantillons sont déposés dans un gel SDS-PAGE. Le premier gel de concentration à 4 % (acrylamide 4 %, bisacrylamide 0,08 %, Tris 125 mM pH 6,8, SDS 0,1 %, TEMED 0,08 %, PAS 0,04 %) sert de support aux puits de dépôt, et à concentrer les protéines au début de la migration. Le second gel de séparation SDS-PAGE à 12 % (acrylamide 12 %, bisacrylamide 0,23 %, Tris 375 mM et pH 8,8, SDS 0,1 %, TEMED 0,08 %, PAS 0,04 %) sert à séparer les protéines selon un gradient de taille, par un maillage moléculaire.

Après polymérisation des gels, 15 μ g de chaque échantillon sont déposés dans un puits formé dans le gel de concentration. Puis le gel SDS-PAGE est placé dans une cuve Biorad remplie de tampon d'électrophorèse TG-SDS 1X fourni par Amresco (USA). La cuve est ensuite reliée à un générateur, générant un courant électrique (1000 mA, 300 W) faisant migrer les protéines, d'abord à 80 V pendant 20 minutes afin de concentrer les protéines dans le premier gel, puis 120 V pendant 1 heure et 30 minutes afin de séparer les protéines dans le second gel (Guillemin *et al.*, 2009). Toute cette opération est réalisée à 4°C.

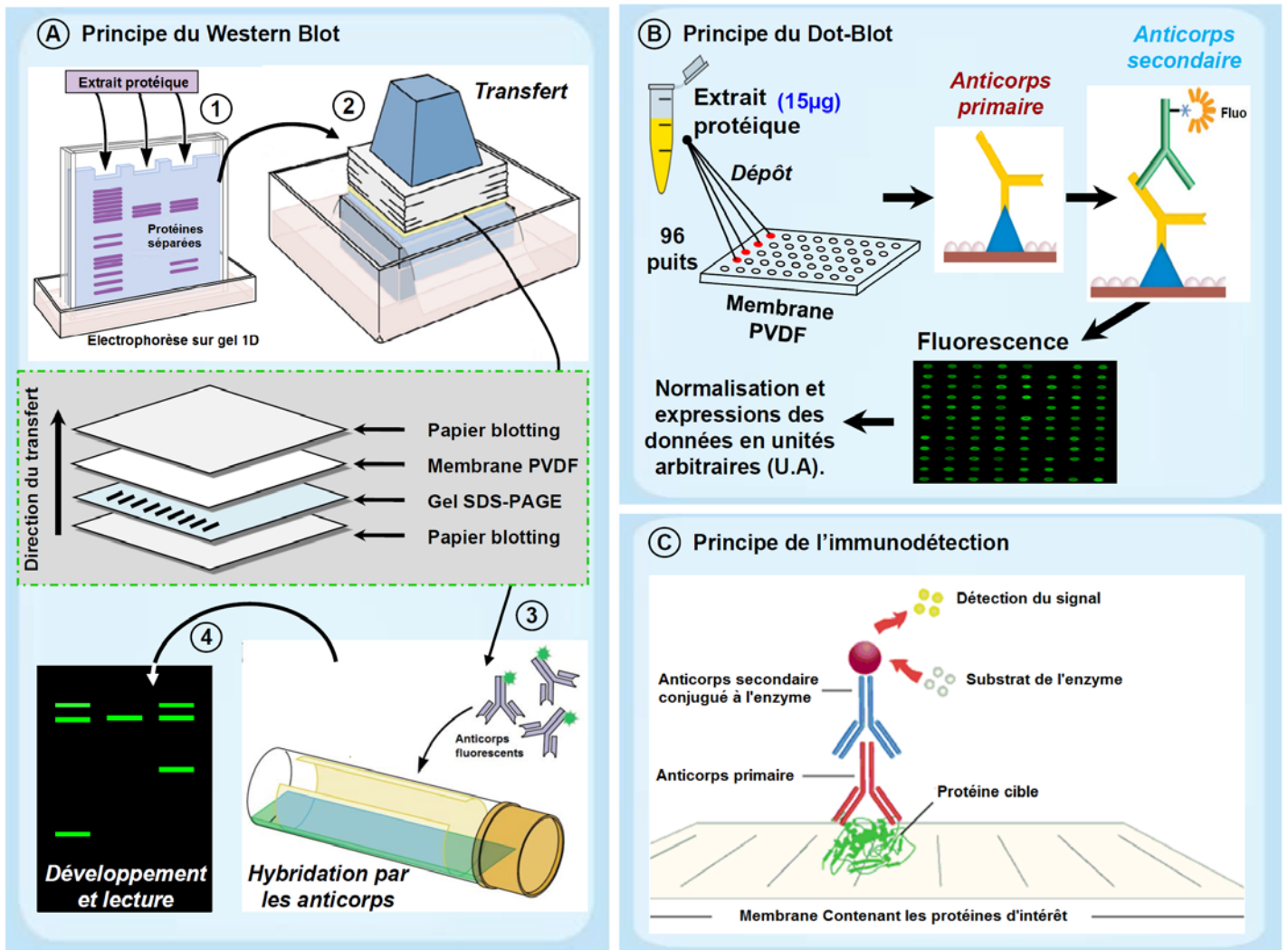


Figure 36. Principes du Western-Blot et du Dot-Blot.

Les deux techniques ayant pour but de détecter les protéines d'intérêts en utilisant un anticorps dirigé, nécessitent l'utilisation d'un extrait protéique à concentration connue.

A) Des échantillons protéiques sont (1) déposés dans un gel d'électrophorèse monodimensionnelle et sont séparées en fonction de leur poids moléculaire. Une fois les protéines ont migré, elles sont (2) transférées sur une membrane qui peut être de nitrocellulose ou de polyfluorure de vinyle (PVDF). La fixation des protéines à la membrane se fait grâce à des interactions hydrophobes et ioniques entre la membrane et les protéines. Le blocage de la membrane (3) s'effectue pour éviter des réactions non spécifiques entre les anticorps et la membrane avant hybridation. Enfin, (4) la révélation (développement) s'effectue après incubation avec l'anticorps secondaire dirigé contre le premier reconnaissant la protéine d'intérêt.

B) Le Dot-Blot s'effectue de la même manière que le Western-Blot sauf qu'on utilise dans ce cas une plaque de 96 puits, sans passer par une électrophorèse. Après dépôt des échantillons, la membrane sera traitée de la même façon comme décrit dans la partie III.8.4.

Une fois la séparation électrophorétique achevée, les protéines contenues dans le gel ont été transférées sur membrane Immobilon-P (membrane PVDF [*PolyVinylideneFluoride*], 0,45 µm, Millipore) préalablement rincée à l'alcool et découpée aux dimensions du gel. Puis l'ensemble est monté entre des feuilles de papier Wathmann, et placé dans une cuve de Transfert Bio-Rad, remplie de tampon de transfert TG 1X d'Amersham. La cuve est reliée à un générateur, fournissant un courant électrique (600 V, 210 mA, 300 W) afin de transférer les protéines du gel vers la membrane pendant 1 heure. Cette opération est réalisée à 4°C.

Une fois le transfert réalisé, les membranes sont lavées avec une solution de T-TBS 1X (Tris-HCl 11,3 mM, Tris Base 8,75 mM, NaCl 0,137 mM, Tween20 0,05 %) à température ambiante. Puis, elles sont saturées avec une solution de T-TBS 1X contenant 10 % de lait écrémé, à 37°C pendant 20 minutes. Les membranes sont ensuite lavées avec le tampon T-TBS 1X. Une solution d'hybridation sans ce tampon T-TBS est préparée avec la concentration optimale d'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt (Tableau 05). La majeure partie des anticorps utilisés a nécessité une optimisation des conditions d'utilisation. Les membranes sont hybridées avec cette solution, à 37°C pendant 1 h 30 min, avant d'être révélées, soit par chimioluminescence, soit par fluorescence. Dans notre cas, la validation des anticorps pour le Dot-Blot, a été effectuée par révélation par fluorescence.

Après hybridation, les membranes sont lavées au T-PBS 1X (NaCl 690 mM, KCl 10 mM, Na₂HPO₄ 45 mM, KH₂PO₄ 5 mM, Tween20 0,1 %), puis incubées dans une solution d'anticorps secondaire fournis par LI-COR Biosciences (anti-souris, anti-lapin, anti-chèvre, selon l'anticorps primaire) pendant 30 minutes à 37°C. Cet anticorps secondaire, couplé à un fluorochrome à son extrémité, est dilué au 1 / 20 000^{ème}. Les membranes sont ensuite lavées avec le T-PBS 1X, puis au PBS (T-PBS 1X sans le Tween20), le tout à l'obscurité. Elles sont ensuite scannées par le scanner à fluorescence Odyssey LICOR à 800 nm. En effet, le fluorochrome fixé à l'anticorps secondaire, lorsqu'il est excité par un laser d'une longueur d'onde de 778 nm, émet un signal fluorescent à une fréquence de 795 nm. Cette excitation est produite par le scanner, qui reçoit ensuite le signal émis par le fluorochrome en réponse (Figure 36). Suite à la révélation, l'image scannée a été enregistrée et traitée par le logiciel ImageQuant si nécessaire.

III.8.4. Quantification proprement dite par la technique du Dot-Blot

Le Dot-Blot a été développé pour la première fois pour la quantification de l'abondance relative des biomarqueurs dans les extraits du muscle bovin par [Guillemin et al. \(2009\)](#).

Cette technique permet de quantifier rapidement un grand nombre d'échantillons et avec une très haute répétabilité ($CV < 10\%$). Ainsi, 15 μg de protéines totales par échantillon sont déposés sur une membrane en nitrocellulose, à l'aide d'un appareil Minifold I Dot-Blot Schleicher & Schuell de 96 puits. Les dépôts sont disposés aléatoirement (disposition préparée par une macro sur une feuille de calcul Excel) sur une membrane portant le nombre de réplicat par échantillons à 4 points. Un standard de mélange de plusieurs échantillons du même lot d'animaux est également déposé afin d'être utilisé pour la normalisation des données. Les membranes sont ensuite séchées à l'air pendant 5 minutes, puis saturées avec une solution de T-TBS 1X contenant 10 % de lait écrémé, à 37°C pendant 20 minutes, puis lavées.

L'hybridation avec le premier anticorps spécifique de chaque protéine analysée (concentrations indiquée dans le Tableau 05) se déroule exactement de la même manière que pour le Western-Blot, dans les conditions définies au préalable par Western-Blot. Toutes les révélations se font en utilisant la fluorescence du second anticorps. La gamme du mélange est utilisée pour convertir l'intensité de fluorescence des 4 points en quantité arbitraire de protéines ciblées par l'anticorps primaire. Cela permet de développer une équation déterminant l'abondance relative des protéines ciblées par l'anticorps primaire en fonction de son intensité de fluorescence au spot correspondant. Cette équation sert à normaliser les données provenant des différentes membranes, ces données étant rapportées à un référentiel commun, la gamme du mélange. La quantité de protéine d'un échantillon est la moyenne des quantités de chacun de ses réplicats, excepté ceux considérés comme aberrants lors de la quantification.

Le traitement du signal doit se faire par analyse d'images grâce au logiciel GenePix Pro v6.0 (Axon) en suivant les mêmes étapes décrites par [Guillemin *et al.* \(2009\)](#). Etant donné la possibilité d'effectuer des répétitions (4 réplicats) par la technique du Dot-Blot, une approche de pré-filtrages des données a été mise en œuvre pour éliminer d'éventuelles valeurs aberrantes principalement dues à la poussière. La technique de l'exclusion des valeurs aberrantes s'est basée sur la différence de la moyenne absolue (*Medium Absolute Difference* (MAD)) et elle a été appliquée avant que les valeurs des quatre échantillons soient moyennées. Enfin, pour rendre les données comparables, les données ont été normalisées en utilisant une approche-régressive en se basant sur le mix de mélange d'échantillon du même groupe d'animaux utilisée et ce pour chaque muscle considéré. Ainsi, le calcul de l'abondance relative des protéines est basé sur le volume normalisé et est exprimée en unités arbitraires.

III.9. Analyses statistiques

Afin d'analyser nos données issues des différentes expérimentations, plusieurs analyses statistiques ont été employées. La majorité ont été réalisées avec le logiciel SAS 9.1 Cary, NC (SAS Institute Inc., 2002) qui permet l'essentiel des analyses pratiquées, tandis que d'autres ont été effectuées à l'aide du logiciel XLStat (Version 2009.1.01. Addinsoft ®) comme un outil rapide d'exploration de données. La préparation des figures a été faite sous Microsoft Office Excel 2007. Le choix des techniques employées dépend à la fois du type de données et du type d'expérimentation concernée. Des **i)** statistiques descriptives (GLM (ANOVA, ANCOVA), corrélations, et analyses en Composantes Principales (ACP)) et **ii)** des statistiques prédictives (Régressions linéaires multiples) ont été exploitées.

III.9.1. Normalité des variables et standardisation des données

Avant de décrire la démarche de chaque analyse statistique effectuée, nous rappelons que les données ont toujours été vérifiées pour leur normalité. Les tests de normalité permettent de vérifier si les données suivent une loi normale ou non. Pour cela nous avons toujours commencé par la réalisation de quelques graphes pour la visualisation de la distribution des données par les histogrammes de fréquence ou les boîtes à moustache « *box-plot* ». Puis des tests de normalité ont été appliqués, étant donné que les approches graphiques n'ont pas la rigueur des techniques statistiques. Dans ce cas, nous avons souvent vérifié les données par le test de Shapiro-Wilk, le test le plus courant car il est puissant pour les faibles effectifs (≤ 50) et son interprétation est simple. Le test est implémenté dans le logiciel XLStat (option « **Tests de normalité** » en choisissant le test de Shapiro-Wilk).

D'autre part, nous avons procédé à une standardisation des données en centrant et réduisant pour un effet donné (race, année de l'expérimentation ou autre), afin d'obtenir de nouvelles variables appelées Z-scores ou variables centrées et réduites, ou tout simplement variables standardisées.

Le calcul des Z-scores peut s'effectuer en utilisant la formule: $z = \frac{x - \mu}{\sigma}$ ou μ est la moyenne de la population pour chaque effet (exemple: race) et σ est l'écart-type de la population.

Dans le cas de ma thèse, le calcul des Z-scores a été souvent effectué en utilisant la procédure « **Proc Standard** » de SAS 9.1 suivant la syntaxe générale ci-après :

Tableau 06. Analyse de variance de l'effet du régime alimentaire sur l'abondance des biomarqueurs (en unités arbitraires) étudiés.

Protéines	RL	RLE	RLEAOV	T	<i>P-values</i>
<i>Protéines de stress thermique (Heat Shock Proteins)</i>					
α B-Crystallin (<i>CRYAB</i>)	20,4	20,3	20,9	19,5	ns
Hsp20 (<i>HSPB6</i>)	19,4	18,8	18,6	17,2	ns
Hsp27 (<i>HSPB1</i>)	22,3	25,4	25,0	19,4	ns
Hsp40 (<i>DNAJA1</i>)	16,7	17,9	17,1	16,9	ns
Hsp70-1A/B (<i>HSPA1B</i>)	18,6	18,7	17,4	18,4	ns
Hsp70-8 (<i>HSPA8</i>)	16,5	16,9	16,4	16,8	ns
Hsp70-Grp75 (<i>HSPA9</i>)	12,6	12,7	12,7	13,2	ns
<i>Métabolisme énergétique</i>					
Enolase 3 (<i>ENO3</i>)	16,4	15,3	14,6	14,2	ns
LDH-B (<i>LDHB</i>)	14,1	14,4	14,9	14,5	ns
MDH1 (<i>MDH1</i>)	14,1	13,6	14,0	13,9	ns
<i>Structure</i>					
CapZ- β (<i>CAPZB</i>)	17,6	17,1	16,6	16,2	ns
α -actin (<i>ACTA1</i>)	17,8	17,7	17,0	18,2	ns
MyLC-1F (<i>MYL1</i>)	15,2	14,8	14,9	15,0	ns
MyBP-H (<i>MYBPH</i>)	13,4	13,7	13,6	14,0	ns
MyHC-IIa	37,6	35,1	36,7	35,3	ns
MyHC-I	23,6	24,0	24,6	23,2	ns
MyHC-IIx+b	38,9	40,9	38,8	41,5	ns
<i>Résistance oxydative</i>					
DJ-1 (<i>PARK7</i>)	16,5	16,7	17,3	15,8	ns
Prdx6 (<i>PRDX6</i>)	14,0	14,0	13,8	14,5	ns
SOD1 (<i>SOD1</i>)	16,3	16,2	17,3	15,8	ns
<i>Protéolyse</i>					
μ -calpaïn (<i>CAPN1</i>)	14,4	15,0	14,9	14,8	ns

Abbréviations : **T** : régime témoin (75%paille et 25% concentré) ; **RL** : régime à base de graines de lin extrudées ; **RLE** : régime à base de graines de lin extrudées enrichi en vitamine E ; **RLEAOV** : régime à base de graines de lin extrudées enrichi en vitamine E et antioxydants de plantes.

```

Proc STANDARD Data=nom_du_jeu_de_données <options> ;
BY <descending> nom_variable ;
{Normalise selon la moyenne et l'écart-type respectifs à chaque groupe d'observations.}
FREQ nom_variable;
{Identifie une variable numérique dont les valeurs représentent la fréquence de chaque observation. Les observations ayant une fréquence valant moins que un ou étant une valeur manquante ne seront pas utilisées lors du calcul de la moyenne et de l'écart-type.}
VAR nom_variable;
{Liste des variables à normaliser.}
WEIGHT nom_variable;
{Identifie une variable numérique dont les valeurs représentent le nombre de sujets que vaut chaque observation.}

RUN;

```

III.9.2. Analyses de variance et comparaison multiples de moyennes

Les analyses de variance (ou ANOVA, ANalysis Of VAriance) à un ou deux facteurs ont été effectuées avec la procédure du modèle linéaire généralisé de SAS 9.1 « **Proc GLM** » (SAS Institute Inc., 2002). Ces analyses ont été réalisées afin d'évaluer l'influence des facteurs de variation (variable dépendante) sur les variables continues quantitatives issues de la caractérisation biochimique ou des paramètres technologiques.

La comparaison multiple des moyennes ajustées (LS-Means) a été réalisée en utilisant l'option PDIFF de la procédure GLM. Globalement, la séparation des moyennes a été effectuée suivant Tukey à $P < 0.05$. Les valeurs de $P < 0,05$ (*); $P < 0,001$ (**); et $P < 0,0001$ (***) sont considérées comme significatives, et les valeurs $P > 0,05$ comme non significatives (NS). Des tolérances, lorsque $P < 0,1$ (t) ont été dans certains cas retenues.

Plusieurs modèles ont été testés en fonction de l'expérimentation considérée. Deux types de modèles ont été utilisés : avec des effets fixes comme le type de muscle, le type racial, le type animal, l'année de l'expérimentation, la température de cuisson ou le jury ; et aussi des modèles dans lesquels ont été rajoutés les effets des interactions correspondantes pour chaque expérimentation comme synthétisé ci-après. Il est à signaler que l'effet du régime alimentaire a été aussi vérifié comme effet fixe sur l'abondance des biomarqueurs analysés (Tableau 06). Les résultats n'ont montré aucun effet significatif ($P > 0,05$) du régime alimentaire, par conséquent, ce paramètre n'a pas été considéré tout au long de la thèse.

Ξ **Modèle à effet fixe sans interaction(s)** $y = \beta_0 1 + \beta_1 1_1 + \dots + \beta_j 1_j + \mu$

$$Y_1 = \mu_1 + E_1 + \dots + E_x + \varepsilon_1$$

Y_1 : valeur observée de la variable à expliquer pour le modèle 1

μ_1 : constante du modèle 1

E_1 : effet fixe 1 (les effets diffèrent d'un article à l'autre selon l'objectif)

...

E_x : effet fixe x

ε_1 : erreur résiduelle du modèle

Ξ **Modèle à effet fixe et avec interaction(s)**

$$Y_2 = \mu_2 + E_1 + E_2 + E_1 * E_2 + \varepsilon_2$$

Y_2 : valeur observée de la variable à expliquer pour le modèle 2

μ_2 : constante du modèle 2

E_1 : effet fixe 1 (les effets diffèrent d'un article à l'autre selon l'objectif)

E_2 : effet fixe 2

$E_1 * E_2$: effet de l'interaction de l'effet 1 avec l'effet 2

ε_2 : erreur résiduelle du modèle 2

Remarque : Le modèle peut être étendu à plus de deux effets, ce n'est qu'à titre démonstratif que cette brève description du modèle a été présentée.

III.9.3. Analyses de covariance

L'analyse de covariance (généralement connu sous le nom ANCOVA) est une analyse statistique qui se situe entre l'analyse de variance et l'analyse de régression et entre dans le cadre général du modèle linéaire.

Dans le cas de notre étude, notamment pour les expérimentations 1 et 3(1), cette méthode a été employée afin de prendre en compte l'effet de la race ou l'année de l'expérimentation dans les modèles. Cette méthode a plusieurs finalités, mais les deux qui sont, probablement, les plus importantes sont : **i)** les comparaisons entre les groupes en tenant en compte, de la variabilité importante des variables à expliquer et **ii)** l'ajustement des comparaisons entre les groupes non équilibrés. Dans le cas de la covariance, une variable explicative est expliquée par au moins une variable quantitative et une qualitative.

Pour exemple, le modèle utilisé dans le traitement des données de l'expérimentation 1 afin de déterminer les relations entre les qualités sensorielles et les caractéristiques musculaires par type animal en prenant en compte le type racial, est explicité ci-après :

Le modèle ANCOVA utilisé est $y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta(x_{ij} - \bar{x}) + \varepsilon_{ij}$ Ou,

y_{ij} valeur de la variable dépendante pour j th observation dans i th type animal.

μ constante globale du modèle de la variable dépendante y_{ij} .

α_i effet (différence) de i th type racial sur la variable dépendante.

β pente de la régression de la variable dépendante avec l'explicative pour le type racial.

x_{ij} valeur de la variable explicative pour j th observation pour chaque i th type racial.

$\bar{x}$ moyenne groupée pour l'ensemble des observations.

ε_{ij} erreur résiduelle associée à j th observation dans i th type animal non expliquée par l'effet du type d'animal dans la variable explicative.

Lorsque le modèle n'est pas significatif ($P < 0,05$), l'effet type racial est enlevé comme covariable du modèle en construction (c'est-à-dire $\alpha_i = 0$), et il devient ainsi une simple régression linéaire dont le modèle général est : $y_{ij} = \mu + \beta(x_{ij} - \bar{x}) + \varepsilon_{ij}$.

III.9.4. Régression multiple

La modélisation des données des descripteurs sensoriels ou du pH ou de la couleur, a été réalisée par régression multiple en utilisant la procédure « **Proc REG** » de SAS 9.1. L'option « Stepwise » ou pas-à-pas a été la plus utilisée pour construire le(s) meilleur(s) modèle(s). De plus, l'exploitation de l'option « meilleur modèle » de Xlstat 2009 a été utilisée et la validation des modèles obtenus a eu lieu sous SAS 9.1 en utilisant la procédure « Proc REG » afin d'obtenir les coefficients de détermination partielle des variables explicatives du modèle.

De manière générale, la régression est présentée comme étant une méthode statistique utilisée pour analyser la relation d'une variable avec à une autre ou plusieurs autres. Cette relation est définie au travers d'un modèle régressif, dont les paramètres sont identifiés lors d'un processus d'ajustement mathématique du modèle par rapport aux données observées. Ainsi, la régression multiple vise à expliquer ou prédire une variable continue à l'aide d'un ensemble de variables dites explicatives (Lebart *et al.*, 1995). Cette analyse a été utilisée dans l'ensemble des expérimentations de cette thèse afin de proposer des modèles prédictifs et/ou explicatifs des variables de qualité des viandes recherchées en utilisant les caractéristiques musculaires ou les protéines biomarqueurs.

La procédure pas-à-pas ou « Stepwise » fonctionne en commençant à retenir les variables explicatives qui ont la corrélation la plus élevée avec la variable de qualité ($P < 0,05$). Pour chaque variable explicative, un coefficient de régression est calculé. Si ce coefficient est significatif ($P < 0,1$), la variable est retenue et une autre variable explicative est sélectionnée pour intégrer le modèle, sur la base de son coefficient de corrélation partiel. L'inclusion de nouvelles variables dans le modèle peut entraîner une diminution de la contribution des autres variables déjà présentes. La significativité des variables déjà présentes est donc de nouveau testée après l'inclusion des nouvelles variables. Si non significatives, les variables sont éliminées du modèle. Ce processus de sélection-élimination est répété jusqu'à ce que toutes les variables du modèle soit significatives et que le modèle ait une explication optimale (meilleure modèle avec de R^2 ajusté en % d'explication élevé).

En plus de la construction du modèle, un ensemble de critères propres à la régression multiple ont été rigoureusement pris en considération pour l'obtention d'un modèle et sa validation. La sélection du modèle optimal pour la variable dépendante en question s'effectue sur la base du coefficient de détermination R^2 ajusté, du critère d'information d'Akaike – AIC (*Akaike Information Criterion*) et aussi du critère RMSE (*Root-Mean-Square Error*). Le coefficient de détermination R^2 permet d'avoir une idée globale de la qualité d'ajustement et il s'interprète aisément comme la proportion de la variabilité expliquée par l'équation de régression. Le critère AIC permet de pénaliser les modèles en fonction du nombre de paramètres afin de satisfaire le critère de parcimonie et on choisit donc le modèle ayant un AIC le plus faible. Le RMSE, est la racine de l'erreur quadratique moyenne qui permet d'évaluer l'intérêt prédictif d'un modèle. Nous considérons donc, qu'un modèle est optimal, si R^2 ajusté est élevé et l'AIC et le RMSE sont plus faibles.

Un autre paramètre à vérifier est la non-colinéarité des variables explicatives. Les liaisons linéaires entre les variables explicatives exercent une influence très importante sur l'efficacité d'une régression multiple et par conséquent sur la stabilité du modèle statistique. C'est ce que nous appelons « **la multicollinéarité** ». Les conséquences de la colinéarité statistique entre les variables explicatives sont les suivantes : **i)** les coefficients de régression estimés peuvent être élevés en valeur absolue; **ii)** leurs signes peuvent être contraires à l'intuition; **iii)** les variances des estimateurs peuvent être élevées; **iv)** les coefficients de régression et le coefficient de corrélation multiple sont instables par rapport aux coefficients de corrélation entre les variables explicatives.

La colinéarité statistique crée donc des difficultés importantes dans l'interprétation des résultats. Il faut éviter d'introduire simultanément dans le modèle initial des variables explicatives qui sont liées ou susceptibles d'être liées linéairement entre elles.

La vérification systématique de l'absence de multicolinéarité entre les variables retenues dans un modèle ou non, s'effectue en calculant pour chaque variable un indice appelé « tolérance » ou son inverse, le VIF « *variance inflation factor* ».

Le facteur d'inflation de la variance est ainsi appelé car il intervient comme multiplicateur de la variance de l'estimateur du coefficient de la variable dans une régression linéaire. La tolérance d'une variable est la proportion de la variance de cette variable qui n'est pas expliquée par les autres variables, c'est-à-dire $1 - R^2$, où R est le coefficient de corrélation multiple de la variable testée avec les autres variables explicatives. Dans la pratique on considère souvent que la tolérance doit être $> 0,5$ et un $VIF \leq 10$. Ces facteurs ont été calculés en utilisant l'option **COLLIN** de SAS. L'inflation f_j est donc d'autant plus grande que la variable X_j est corrélée à une combinaison linéaire des autres variables explicatives.

Pour que la régression linéaire puisse être établie, il faut également que le nombre d'observations soit supérieur au nombre de variables. Il faut également, lors de la sélection des variables explicatives incluses dans le modèle, appliquer un principe de parcimonie : le nombre de variables explicatives dans une équation est limité à 10% du nombre d'échantillons utilisés pour l'étalonnage afin d'éviter un sur-ajustement (McNamee, 2005). Afin de respecter les règles ci-dessus pour l'ensemble des modèles statistiques développées dans cette thèse, le nombre de variables a été limité de 2 à 4 selon l'expérimentation malgré la possibilité d'obtention des modèles prédictifs avec des pourcentages d'explication de la variabilité très élevés en acceptant 5 ou plus variables explicatives.

III.9.5. Analyse de corrélations de Pearson

L'intensité de la liaison linéaire entre deux variables continues peut être mesurée par le coefficient de corrélation linéaire (ou r de Pearson). Dans notre cas, les corrélations ont été calculées en utilisant la procédure « **Proc CORR** » de SAS 9.1. Les corrélations au seuil de signification $P < 0.05$ sont considérées significatives. Les valeurs de $P < 0,05$ (*); $P < 0,001$ (**); et $P < 0,0001$ (***) sont considérées comme significatives, et les valeurs de $P > 0,05$ sont considérées comme non significatives (NS). Des tolérances, lorsque $P < 0,1$ (t) ont été dans certains cas retenues et présentées.

III.9.6. Analyse en Composantes Principales

Les méthodes les plus classiques de la statistique descriptive multidimensionnelle sont les méthodes factorielles. Elles consistent à rechercher des facteurs en nombre restreint et résumant le mieux possible les données considérées. Parmi ces analyses multidimensionnelles, on retrouve l'analyse en composantes principales ou ACP. L'ACP est une technique d'analyse de données utilisée pour réduire la dimension de l'espace de représentation des données. Contrairement à d'autres méthodes de sélection, celle-ci porte uniquement sur les variables, indépendamment des grandeurs que l'on cherche à modéliser. Les variables initiales sont remplacées par de nouvelles variables, appelées composantes principales ou axes principaux, non corrélées deux à deux, et telles que les projections des données sur ces composantes (axes) soient de variance maximale.

Les principaux axes de l'ACP (généralement que deux dans toutes les ACPs de cette thèse) sont ceux qui maximisent l'inertie du nuage projeté, c'est-à-dire la moyenne pondérée des carrés des distances des points projetés à leur centre de gravité. Cette maximisation de l'inertie utilisée comme critère dans toutes nos analyses, nous a permis de préserver au mieux la répartition des points. Dès lors, les (n) composantes principales peuvent être représentées dans l'espace sous-tendu par ces axes, par une projection orthogonale des (n) vecteurs d'observations sur les (k) axes principaux. Dans mon cas, le choix des deux premiers axes factoriels m'a souvent permis la projection des variables à être le plus proche possible du cercle des corrélations ($> 0,5$). Ceci est possible en calculant les pourcentages de l'inertie totale expliquée et le critère de *Kaiser* (donné ci-après). De plus, l'axe de la première composante (PC1) a souvent exprimé la proportion la plus importante de la variance totale. La variance restante inexpliquée par le premier axe a été expliquée par le second.

L'ensemble des ACP réalisées dans cette thèse ont été conduites sous le logiciel SAS 9.1 en utilisant la procédure « **Proc PRINCOMP** ». L'ACP nous a permis d'appréhender et de montrer les différences entre groupes ou d'obtenir une meilleure visualisation des relations entre les caractéristiques quantitatives et les propriétés de la qualité de la viande recherchées.

Lors de l'étude de la relation avec les données de qualités organoleptiques, l'ACP a permis dans certains cas de sélectionner les variables prédictives à inclure dans le(s) modèle(s), de façon à limiter le nombre de variables prédictives et à supprimer les variables corrélées entre elles.

Comme évoquer précédemment, l'analyse factorielle début par la mesure de l'adéquacité de l'échantillonnage par le test de Kaiser-Meyer-Olkin ou KMO (*Kaiser's Measure of Sampling Adequacy* or MSA en anglais). Il indique jusqu'à quel point l'ensemble de variables retenu est un ensemble cohérent et permet de constituer une ou des mesures adéquates de concepts. Les statistiques se calculent aussi bien pour l'ensemble de la matrice des corrélations que pour chacune des variables et prennent des valeurs sur l'échelle de 0 à 1. Une variable pertinente pour l'analyse devrait obtenir un KMO supérieur à 0,5. [Kaiser \(1974\)](#) propose une impressionnante échelle de valeur pour le KMO : **i)** Inacceptable en dessous de 0,5 ; **ii)** Médiocre entre 0,5 et 0,6 ; **iii)** Moyen entre 0,6 et 0,7 ; **iv)** Bien entre 0,7 et 0,8 ; **v)** Très bien entre 0,8 et **vi)** 0,9 et Excellent au delà de 0.9. Il ressort qu'un KMO élevé indique qu'il existe une solution factorielle statistiquement acceptable qui représente les relations entre les variables. Une fois toutes ces analyses effectuées et les ajustements faits, l'ACP devrait donner des résultats concluants.

Le MSA ou KMO a été calculé sous SAS 9.1 en utilisant la procédure « **Proc FACTOR** » comme le montre le script suivant :

```
ods graphics on;  
Proc factor data = Nom_du_fichier(MOMO.xls)  
Priors = smc msa residual  
Rotate = promax reorder plot  
Outstat = fact_all  
Plots = (scree initloadings preloadings loadings);  
Run;  
ods graphics off;
```

Résultats de la thèse

Qualité sensorielle

Effets de la température de cuisson et jury

Introduction

La qualité gustative est l'une des propriétés les plus importantes au travers de laquelle les consommateurs jugent la viande (Grunert *et al.*, 2004). Bien que des facteurs tels que la quantité de graisse visuelle et la couleur de la viande ou des facteurs extrinsèques tels que le prix, la marque, etc. (Hocquette *et al.*, 2012) influencent l'achat, les qualités de la viande telles que le goût et la tendreté jouent un rôle prépondérant dans les décisions d'achat (Grunert *et al.*, 2004; Monson *et al.*, 2005). L'appréciation globale et les préférences individuelles des consommateurs dépendent des réponses sensorielles individuelles au cours de la consommation de la viande, y compris la perception de la tendreté, la jutosité et la flaveur (Gagaoua *et al.*, 2013; Jeremiah & Gibson, 2003). Il est généralement admis que la tendreté est l'attribut sensoriel le plus recherché pour la viande de bœuf en comparaison aux autres attributs (Huffman *et al.*, 1996). Par ailleurs, de nombreuses études ont indiqué que les consommateurs sont prêts à payer plus cher lorsque une viande de qualité garantie leur a été proposée (Boleman *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 2001; Platter *et al.*, 2005).

Malgré les efforts considérables pour améliorer la qualité gustative de la viande bovine, les recherches actuelles ont montré qu'un niveau élevé de variabilité incontrôlée subsiste pour la tendreté (Maher *et al.*, 2004). C'est la raison pour laquelle les consommateurs souhaiteraient aujourd'hui un système de prédiction de la qualité gustative de la viande bovine, qui pourrait être efficace, simple, suffisamment documenté et surtout contrôlé par un tiers indépendant (Verbeke *et al.*, 2010). Il est aussi connu que la qualité gustative est influencée par des facteurs génétiques et environnementaux, tels que le sexe, l'âge, et le régime alimentaire, ainsi que les conditions pré- et post-abattage (Hocquette *et al.*, 2012). De plus, la cuisson est un facteur important, étant l'ultime étape appliquée sur un morceau de viande avant sa consommation et elle conditionne les propriétés organoleptiques finales d'une viande cuite (Obuz & Dikeman, 2003). Il a été aussi rapporté que les préférences des consommateurs dépendent de leurs expériences culturelles et leurs habitudes alimentaires (Dransfield *et al.*, 1984; Grunert *et al.*, 2004; Oliver *et al.*, 2006).

L'objectif principal de cette étude, était de comparer les notes des attributs de la qualité de la viande des échantillons de taurillons cuits à deux températures de cuisson (55°C et 74°C) et dégustés par deux jurys sensoriels, un jury Français et un jury Anglais. Le panel Anglais, en plus des échantillons de taurillons, a aussi évalué des échantillons de viande de génisses et de bœufs cuits aux mêmes températures de cuisson. Les résultats de cette étude nous permettront de tirer des conclusions sur les recherches futures à mettre en place pour les panels Maghrébins, notamment Algériens en fixant le protocole expérimental. Il est à signaler qu'il existe aujourd'hui un système de classification et prédiction de viande bovine spécifique (système MSA pour *Meat Standard Australia*) qui est utilisé dans de nombreux pays ou régions du monde, sauf pour le Maghreb où il est temps de développer un outil prédictif se basant sur les études antérieures. De plus, il s'agit aussi d'une étude, qui est menée afin de bien caractériser l'impact de la température de cuisson d'une part, et de l'effet de l'origine des consommateurs d'autre part, sur l'appréciation globale et les préférences gustatives de la viande bovine. Ceci nous permettra de cerner au mieux la contribution des attributs sensoriels sur l'appréciation globale en fonction de la température de cuisson et l'origine des dégustateurs.

Publication n° 01

Effect of end-point temperature during cooking on beef sensory characteristics: likes and dislikes of French and UK panellists

M. Gagaoua, D. Micol, B. Picard, E.M.C. Terlouw, A.P. Moloney, H. Juin, K. Meteau, A. Boudjellal, N.D. Scollan, R.I. Richardson, J.F. Hocquette

Soumis pour publication dans Meat Science (2015) xx, xxx - xxx

Résumé :

Afin de déterminer ce qui oriente les préférences de consommation et d'acceptabilité de la viande bovine, cette étude avait pour objectif de comparer les notes attribuées par deux jurys de dégustation d'origine différente (France et Royaume-Uni) pour les mêmes échantillons de viande grillée à deux températures de cuisson à savoir 55°C et 74°C. Les échantillons de viande de taurillons ont été évalués par les deux jurys. Par contre, le jury Anglais a, en plus de ces échantillons, évalué aussi des échantillons de viande de génisses et de bœufs cuits aux mêmes températures. Les notes de tendreté et de jutosité étaient plus élevées après cuisson à 55 qu'à 74°C, et ceci quel que soit le type animal ou le pays d'origine des dégustateurs. Comparé au jury Anglais, le jury Français a attribué des notes plus élevées pour la flaveur et des notes plus faibles pour la jutosité et l'appréciation globale, indépendamment de la température de cuisson. Des interactions (jury x températures de cuisson) significatives ont été trouvées sur l'ensemble des attributs sensoriels avec des effets marquants pour la jutosité, la flaveur et la flaveur anormale. Le jury Anglais a attribué des notes plus élevées pour l'appréciation globale de la viande de bœufs par rapport aux génisses et taurillons, et ce, aux deux températures de cuisson. Considérant toutes ces données, pour le jury Anglais, l'appréciation globale était positivement corrélée avec la flaveur et la tendreté et négativement avec la flaveur anormale. Pour le jury Français, l'appréciation globale était positivement corrélée avec la jutosité, la tendreté et la flaveur. Les analyses de régression multiples ont montré que les attributs retenus pour l'appréciation globale diffèrent entre les deux jurys. Pour le jury Anglais, l'appréciation globale dépend fortement de la flaveur et pour le jury Français, principalement de la tendreté et jutosité.

Mots clés : Bovin; qualités sensorielles de la viande; température de cuisson; appréciation globale; prédiction.

Effect of end-point temperature during cooking on beef sensory characteristics: likes and dislikes of French and UK panellists

M. Gagaoua^{1,3}, D. Micol^{1,2}, B. Picard^{1,2}, E.M.C. Terlouw^{1,2}, A.P. Moloney⁴, H. Juin⁵, K. Meteau⁵, A. Boudjellal³, N.D. Scollan⁶, R.I. Richardson⁷, J.F. Hocquette^{1,2 (*)}

¹ INRA, UMRH 1213, Unité de Recherches sur les Herbivores, Theix, 63122 Saint Genès Champanelle, France

² VetAgro Sup, UMRH 1213, Unité de Recherches sur les Herbivores, Theix, 63122 Saint Genès Champanelle, France

³ Equipe Maquav, INATAA, Université des Frères Mentouri Constantine 1, Route de Ain El-Bey, 25000 Constantine, Algeria

⁴ Teagasc, Animal and Grassland Research and Innovation Centre, Grange, Dunsany, Co. Meath, Ireland

⁵ INRA, UE1206, Elevage Alternatif et Santé Animale, Le Magneraud, F-17700 Saint Pierre d'Amilly, France

⁶ Institute of Biological, Environmental and Rural Sciences, Aberystwyth University, Gogerddan, SY23 3EB, UK

⁷ Division of Farm Animal Science, University of Bristol, Langford, Bristol, BS40 5DU, UK

(*) Correspondence: Jean-François Hocquette: jean-francois.hocquette@clermont.inra.fr

Abstract

To identify the main drivers of meat eating acceptability, this study compared eating quality scores of the same meat samples cooked to different end-point temperatures (55°C vs. 74°C) and the country of origin of the panellists (France and the UK). Meat samples from young bulls were assessed in both countries whereas the UK panel tested further meat samples from heifers and steers cooked at 55 and 74°C. Tenderness and juiciness scores were higher after cooking at 55 than 74°C, irrespective of the animal type from which they were obtained and country of origin of the panellists. Compared to the UK panel, the French panel gave higher scores for beef flavour and lower scores for juiciness and overall liking, irrespective of cooking temperature. The panel x cooking temperature interaction was significant for all sensory scores with strong effects for juiciness, beef flavour and abnormal flavour. The UK panel gave higher overall liking scores to meat from steers compared to heifers and young bulls at both cooking temperatures. Considering all available data, for the UK panel, overall liking was positively related with beef flavour and tenderness and negatively related with abnormal beef flavour. For the French panel, overall liking was positively related with juiciness, tenderness and beef flavour. Regression analyses showed that the drivers of overall liking differed also between UK and French panels. For the UK panel, overall liking depended strongly on flavour and for the French panel, predominantly on tenderness and juiciness.

Key words: Beef; meat sensory qualities; cooking temperature; overall liking; prediction.

1. Introduction

Eating quality is one of the most important characteristics by which consumers assess beef ([Grunert, Bredahl, & Brunsø, 2004](#)). Although factors such as the amount of visual fat and the colour of the meat or extrinsic factors such as price, brand, etc. (reviewed by ([Hocquette et al., 2012](#)) influence purchase, aspects of the meat such as taste and tenderness play an important role in the decision to re-purchase after consumption of the meat ([Gagaoua, Micol, Richardson, et al., 2013](#); [Grunert et al., 2004](#); [Monson, Sanudo, & Sierra, 2005](#)). Overall liking and the individual preferences of consumers depend on the individual sensory responses during meat consumption, including perception of tenderness, juiciness, and flavour ([Gagaoua, Micol, Richardson, et al., 2013](#); [Jeremiah & Gibson, 2003](#)). It is generally believed that tenderness is the most important sensory trait of beef meat in comparison to the other attributes ([Huffman et al., 1996](#)). Various studies indicate that consumers are willing to pay a premium for beef meat provided if it is guaranteed tender ([Boleman et al., 1997](#); [Miller, Carr, Ramsey, Crockett, & Hoover, 2001](#); [Platter et al., 2005](#)).

Despite considerable efforts to improve beef eating quality, research has shown that there can still be a high level of uncontrolled variability in beef tenderness ([Maher, Mullen, Moloney, Buckley, & Kerry, 2004](#)). This may be the reason why consumers would like a system to predict beef eating quality, which is adequate, simple, sufficiently documented and controlled by an independent third party ([Verbeke et al., 2010](#)). Eating quality is influenced by both genetic and environmental factors including genotype, age, and diet, as well as pre-slaughtering management and *post-mortem* processing conditions. In addition, cooking is the final step applied prior to consumption and gives meat its final characteristics and therefore, an important factor ([Obuz & Dikeman, 2003](#)). Meat preferences of taste panellists depend further on their previous cultural experiences and eating habits ([Dransfield et al., 1984](#); [Grunert et al., 2004](#); [Oliver et al., 2006](#)).

The main objective of this study was to compare beef eating quality scores of the same meat samples cooked to two end-point temperatures (55°C or 74°C, typical in France and UK respectively) and according to the country origin of the panellists (France and UK). The UK panel tested further meat samples from heifers and steers cooked at 55 and 74°C. Results allowed an evaluation of the effect of cultural background on preferences of panellists. This will increase our understanding of the contribution of various sensory attributes to the overall liking prediction according to cooking temperature and to the country origin of the panellists.

2. Materials and methods

Animal handling followed the European Union directive number 86/609/EEC concerning animal care.

2.1. Animals and diets

This study was conducted as part of the European “ProSafeBeef” project (www.prosafebeef.eu). The overall aim of “ProSafeBeef” was to improve safety and quality in beef production and processing, across Europe through research and innovation. This study was based on 240 cattle including young bulls, steers and heifers reared in three European experimental research centres, France, UK and Ireland, respectively (**Table 1**). The experiment in France involved 74 young bulls of 3 different breeds: Limousin (Li), Blond d’Aquitaine (BA) and Aberdeen Angus (AA). The experiment in Ireland involved 96 heifer calves of two genotypes, Belgian-Blue x Holstein-Friesian (BF) and Aberdeen Angus x Holstein-Friesian (AF). The experiment in United Kingdom involved 72 steers half of which were Belgian-Blue x Holstein (BH) and the other half Charolais crossbred (CHx). During the finishing period, in the three experimental farms, the animals were kept in either extensive (grazing) or intensive conditions (indoors) ([Gagaoua, Micol, Hocquette, et al., 2013](#)). Basal diets offered to the animals consisted of pasture, grass silage or high concentrate diets, and were supplemented with lipids and/or antioxidants from plants additives.

2.2. Slaughtering and sampling

Animals were slaughtered when they achieved fat class 3 on the EUROP grid of carcass classification (European Economic Community Regulations (EEC) No. 1208/81). They were slaughtered under standard conditions in either a commercial or an experimental slaughterhouse, depending on the facilities of each country. The carcasses were not electrically stimulated and they were chilled and stored at 4°C until 24 h *postmortem*. The *Longissimus thoracis* (LT) muscle was excised from the right side of each carcass 24 h after slaughter. The samples were cut into steaks and placed in sealed plastic bags under vacuum and kept between 2 – 4°C for 14 days (young bulls from France and heifers from Ireland) or 10 days (steers from UK) for ageing. Each loin sample was then frozen and stored at –20°C until sensory assessment.

2.3. Sensory panel evaluation

Sensory assessment was conducted in two laboratories using similar sensory protocols. Meat samples from the young bulls (France) were assessed for sensory scores in France (FR,

Le Magneraud). Meat samples from the heifers (Ireland), the steers (UK) and the young bulls (France) were assessed for sensory scores in the United Kingdom (UK, Bristol) (**Table 1**). Approximately forty hours before sensory assessment, samples were thawed, without stacking or overlapping, at 4–5°C. The morning of the analysis, the meat samples were cut into two 1.50 cm steaks. In France they were grilled between two contact plates heated to 310°C. Steaks were heated for 2 min between two aluminium sheets, until the end-points temperature of 55°C usually used in France or 74°C usually used in the UK in the geometric centre of the steak was reached. After grilling, each steak was cut into twelve 3 x 2 x 1.5 cm portions which were immediately presented to 12 panellists trained in beef meat sensory analysis (one portion per panellist). The panellists rated the steaks on a 0 to 10 unstructured scale to evaluate the following attributes: global tenderness (0 – extremely tough, 10 – extremely tender), juiciness (0 – extremely dry, 10 – extremely juicy), beef flavour intensity (0 – extremely weak, 10 – extremely strong), abnormal flavour intensity (0 – extremely weak, 10 – extremely strong) and overall liking (0 – dislike very much, 10 – like very much). The sessions were carried out in a sensory analysis room equipped with individual boxes under artificial non-coloured lighting. The marks of the panellists on the line scales were then converted to numbers by measuring the position of each one. The FIZZ program (Fizz v 2.20h, Biosystemes, Couternon, France) was used for data entry, formatted in Excel. In the UK 1.9 cm thick steaks were cooked under domestic grills, turning every two minutes until the required temperature as measured in the geometric centre of the steak (measured by a thermocouple probe) was reached. After grilling, each steak was cut into 3 x 2 x 2 cm portions which were immediately presented to the panellists. Each tasting booth was equipped with computer terminals linked to a fileserver also running a sensory software programme (FIZZ v 2.20h, Biosystemes, Couternon, France) that facilitated the direct entry of assessor ratings on a scale of 1-8. Assessors used a standard 8 point category scale for the same attributes, where for tenderness 1= extremely tough, 2 = very tough, 3 = moderately tough 4 = slightly tough 5 = slightly tender, 6 = moderately tender, 7 = very tender and 8 = extremely tender, similarly for juiciness, beef flavour and abnormal beef flavour.

2.4. Statistical analysis

For that purpose, data from the Bristol panel were first converted to a 10 point scale to be comparable to the French data. Variance analyses were carried out using the PROC GLM of SAS (SAS Version 9.1. SAS institute Inc., Cary, NC) separately for each rearing site/gender and country of origin of the panel, to test the effect of cooking temperature (**Table 1**). For the

complete data set for young bulls, the effect of cooking temperature, the country of origin of the panels and their interaction was tested. Least square means separation was carried out using the Tukey test and the effects were considered as significant at $P < 0.05$.

To study relationships between overall liking and other sensory ratings, Z-scores were calculated for each temperature to remove the animal type (gender and breed) and country effects. Z-scores represent the deviation of each observation relative to the mean of the corresponding animal type in each country and were calculated using the PROC STANDARD of SAS, which standardizes data to a mean of 0 and standard deviation of 1. More precisely, the standard score of a raw score x was calculated using the following formula: $z = \frac{x - \mu}{\sigma}$ where: μ is the mean animal type and σ is the standard deviation of each corresponding animal type.

The PROC CORR of SAS was used to determine the Pearson's correlation coefficients between the attributes. Correlation values were considered if they were significant to $P < 0.05$.

Multiple regression analyses were subsequently performed on Z-scores using PROC REG (SAS Version 9.1. SAS institute Inc., Cary, NC) to create optimal models (maximal adjusted r^2) and explain overall liking according to end-point cooking temperatures and according to the country of origin of the sensory panel (UK vs FR) using global tenderness, juiciness, beef flavour intensity and abnormal flavour intensity attributes scores. A maximal number of 4 explanatory variables were retained, if significant in the model. Partial R-squares and the significance of each retained variable are given for all the models. Model accuracy was compared using different statistics: the adjusted coefficient of determination (adj. R^2), the Akaike information criterion (AIC) and the root-mean-square error (RMSE). The absence of collinearity was verified for each model, by producing condition indices and variance proportions using the COLLIN option of SAS. Attributes were identified as collinear if they possessed both a high condition index > 10 and a proportion of variation > 0.5 for two or more traits.

Principal component analyses (PCA's) were carried out to visually illustrate the effects of temperature within the UK panellists and the effects of country of origin and temperature (bulls only). The PCA's were based on partial datasets of the Z-scores calculated per animal type, country of origin of the panel and end-point cooking temperatures using PROC PRINCOMP of SAS. The Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) measure, known also as Kaiser's Measure of Sampling

Adequacy (MSA) was applied to test the validity of the sampling. The overall MSAs were computed using PROC FACTOR of SAS and are given for each PCA.

3. Results

3.1. Effect of end-point cooking temperature on sensory attributes

Sensory analyses carried out in the UK (**Tables 2 and 3**) showed that for all animal genders (steers, heifers and young bulls), tenderness, juiciness and abnormal flavour scores were higher ($P < 0.0001$) at 55 than at 74°C, ranging between +11 to +18% for steers and heifers (**Table 2**) and +19 to +42% for young bulls (**Table 3**). In contrast, beef flavour score was lower ($P < 0.0001$) after cooking at 55°C than at 74°C: -5% for heifers, -12% for steers (**Table 2**) and -16% for young bulls (**Table 3**). Overall liking was higher at 74°C than at 55°C for heifers (+6%, $P < 0.01$, **Table 2**) and for steers (+41%, $P < 0.0001$, **Table 2**) but not for young bulls (**Table 3**). Considering only the results of the UK panel, overall liking was higher for steers than heifers ($P < 0.0001$) and higher for heifers compared to bulls ($P < 0.0001$) after cooking at 74°C. Overall liking was higher ($P < 0.0001$) for steers compared to heifers and bulls after cooking at 55°C.

When considering the French panel for samples from young bulls only (**Table 3**), similar to that noted by the UK panel, tenderness and juiciness scores were higher (+14 and +31% respectively, $P < 0.0001$) at 55°C than 74°C. However, unlike for the UK panel, abnormal flavour score was higher at 74°C than 55°C (+31%, $P < 0.0001$), overall liking score was higher at 55°C (+17%, $P < 0.05$) and no difference was observed between flavour scores.

3.2. Effect of country of origin of the panellists on the sensory attributes for beef from young bulls

Tenderness scores were higher for the UK compared to the French panel after cooking at 74°C (4.29 vs. 3.80, +13%, $P < 0.05$), but not at 55°C due to a significant panel x temperature interaction (**Table 3**), but average tenderness scores did not differ according to the country of origin of the panellists for samples from young bulls (**Table 3**).

On average, juiciness scores were higher for the UK compared to the French panel (+27% and +37% at 74 and 55°C respectively, $P < 0.0001$), with a highly significant panel x temperature interaction ($P < 0.0001$). Similarly, overall liking scores were also higher for the UK than the French panel (+38% and +22% at 74 and 55°C respectively, $P < 0.0001$). In

addition, overall liking scores were lower at 74°C for the French panel but not for the British one.

By contrast, beef flavour scores were higher for the French compared to the UK panel (+20% and +48% at 74 and 55°C respectively, $P < 0.0001$). The panel x temperature interaction was significant due to the absence of a difference of an effect of cooking temperature for beef flavour for the French in contrast to the UK panel. In addition, beef flavour scores were lower at 55°C for the British panel but not for the French one.

Whereas average scores for abnormal flavour did not differ according to the country of origin of the panellists, a significant panel x temperature interaction was observed due to a higher abnormal flavour score at 55°C and at 74°C for the UK and French panels respectively.

3.3. Relationships between sensory attributes

Consistent correlations in partial datasets of the Z-scores were found between the different sensory attributes at the two cooking end-point temperatures for the samples assessed by the UK panel (**Fig. 1**). Overall liking was significantly and positively correlated with beef flavour ($P < 0.0001$; $r = 0.61$ and 0.66 at 55 and 74°C, respectively) and tenderness, albeit lower at 55°C ($P < 0.0001$; $r = 0.31$) than at 74°C ($P < 0.0001$; $r = 0.47$). Overall liking was further negatively correlated with abnormal flavour ($P < 0.0001$; $r = -0.60$ and -0.59), while no relationships were found between overall liking and juiciness, irrespective of cooking temperature. Beef flavour was significantly and negatively correlated with abnormal flavour ($P < 0.0001$; $r = -0.60$ and -0.53). Juiciness and tenderness were positively correlated ($P < 0.0001$; $r = 0.31$ vs. 0.32 ; at 55 and 74°C, respectively).

Similarly, when the UK and FR assessments of the samples of young bulls only were considered, consistent correlations were found between the different sensory attributes (**Fig. 2**). Some correlations for the UK and French panels were similar to those found for the complete UK data set (**Fig. 2a**). At both 55 and 74°C, overall liking was positively correlated with beef flavour ($P < 0.0001$; $r = -0.61$ and $r = 0.74$) and tenderness ($r = 0.39$, $P < 0.001$; and $r = 0.65$, $P < 0.0001$). Overall liking and abnormal flavour were negatively correlated for the UK panel ($P < 0.0001$; $r = -0.82$ and $r = -0.70$). For the French panel, this correlation was weak ($P < 0.01$; $r = -0.38$) or not significant (**Fig. 2b**). No relationships were found between overall liking and juiciness at either temperature for the UK panel whereas this relationship was significant ($P < 0.0001$) for the French panel ($r = 0.45$ and $r = 0.71$). In addition, juiciness was positively

correlated with beef flavour for the French panel only at 55°C ($r=0.24$, $P < 0.05$) and 74°C ($r = 0.49$, $P < 0.0001$).

Relationships between sensory scores were visualized using a PCA graph. When the PCA was computed using the UK sensory ratings of samples of all animal types (**Fig. 3a**), 52.2 % of the variability was explained with the first two axes with an overall Kaiser's Measure of Sampling Adequacy (MSA) of 0.67. The first principal component explaining 33.9% was mainly characterized by global tenderness, beef flavour and overall liking on the positive side, and abnormal flavour on the negative side. Apart from juiciness, all attributes scored over 0.5 on the first principal component. Overall liking and beef flavour assessed at 55°C were projected opposite to abnormal flavour on the second component which illustrates the negative correlations between these variables.

PCA combining the UK and FR sensory ratings of the young bulls samples (**Fig. 3b**) explained 45.3% of the variability with the first two axes and giving an overall MSA of 0.70. Again, abnormal flavour ratings at both temperatures for the two panels were projected opposite to the overall liking and beef flavour scores for the UK panel. The four global tenderness scores were projected together reflecting positive correlations between these four variables.

The PCA illustrates the effects of end-point cooking temperatures according to country of origin of the panellists. First, juiciness was associated with tenderness at both temperatures for French panellists only. Second, beef flavour was associated with tenderness at both temperatures for French panellists and with overall liking at both temperatures for UK panellists. Third, overall liking was relatively strongly associated with beef flavour (positively) and abnormal flavour (negatively) at both temperatures for UK panellists and relatively strongly associated with juiciness, tenderness and beef flavour (all positively) for French panellists.

3.4. Contribution of various sensory attributes to the overall liking regression models

Results of the correlation analyses were further interpreted using regression analyses to determine how the individual sensory attributes contribute to overall liking scores. Statistically significant variables that consistently added to predictive ability were retained in the model, whereas those variables that demonstrated no relationship or were inconsistent were discarded. Tenderness, abnormal flavour and beef flavour variables were included in the models for overall liking in the case of heifers and young bulls assessed by the UK panel (**Table 4**).

Abnormal flavour and beef flavour variables were the only variables included in the models of steers at 55°C only. Juiciness did not contribute to overall liking for the UK panel, irrespective of animal type or cooking temperature. In contrast, juiciness, in addition to tenderness and beef flavour were included in the model of overall liking in the case of young bulls assessed by the FR panel. Abnormal flavour was not retained in the overall liking regression model of the FR panel.

Regression analyses on the overall liking of heifer samples assessed in the UK (**Table 4**) retained beef flavour, tenderness and abnormal flavour explaining 49 and 67% of the variability between samples, cooked at 55 and 74°C, respectively. The results showed that overall liking was driven by beef flavour (partial R-square = 0.32 vs. 0.41) followed by tenderness (partial R-square = 0.12 vs. 0.13) and abnormal flavour (partial R-square = 0.05 vs. 0.13), at 55 and 74°C, respectively.

Regression analyses on the overall liking of samples of steers in the UK cooked at 74°C assessed in the UK (**Table 4**) retained also beef flavour, tenderness and abnormal flavour explaining 53% of the variability between samples. The regression equation for the overall liking of samples of steers cooked at 55°C retained only abnormal flavour and beef flavour and explained only 33% of the variability.

For the young bulls assessed in the UK, regression equations (**Table 4**) found that beef flavour, tenderness and abnormal flavour explained 77 and 68 % of the variability in overall liking of beef samples cooked at 55 and 74 °C, respectively. Juiciness was not retained in the models. Irrespective of end-point cooking temperature, abnormal flavour had the largest impact on overall liking explaining 65 % and 46%, at 55 and 74°C, respectively.

For the young bulls assessed by the panel from France, regression equations (**Table 4**) found that beef flavour, tenderness and juiciness explained 56 and 62 % of the variability in overall liking of samples cooked at 55 and 74°C, respectively. Tenderness had the largest impact after cooking at 55°C and juiciness after cooking at 74°C on overall liking. Beef flavour was the second variable to influence the overall liking at both cooking temperatures.

4. Discussion

Understanding consumers' perception of beef meat attributes, such as tenderness, juiciness, flavour and overall acceptability is of great importance for the meat industry but these

attributes differ according to cooking temperatures as shown in this study with the same beef samples.

4.1. Effect of end-point cooking temperature on sensory attributes

4.1.1. Tenderness and juiciness

The results showed that irrespective of animal type and country of origin of the panellists, tenderness and juiciness scores were higher at 55°C than at 74°C.

Tenderness findings are in agreement with numerous studies reporting higher tenderness (or low toughness) when meat is cooked at lower temperatures (< 60°C) ([Bejerholm, Tørngren, & Aaslyng, 2014](#); [Cross, Stanfield, & Koch, 1976](#); [Gomes, Pflanzner, de Felício, & Bolini, 2014](#); [Joseph, Awosanya, Adeniran, & Otagba, 1997](#); [Mortensen, Frøst, Skibsted, & Risbo, 2012](#); [Tørnberg, 2005](#)). For example, ([Lorenzen, Davuluri, Adhikari, & Grün, 2005](#)) reported that acceptability of tenderness decreased as end-point temperature increased from 55 to 82°C. Similarly, ([Lorenzen et al., 2003](#)) found that shear values for top sirloin steaks increased with increasing endpoint temperature. Indeed, cooking is believed to have a marked effect on meat tenderness due to modification of both the connective and the myofibrillar structures (actin and myosin) as a result of thermal transitions ([Bejerholm et al., 2014](#); [Dubost et al., 2013](#); [Martens, Stabursvik, & Martens, 1982](#); [Purslow, 2014](#)). According to ([Christensen, Purslow, & Larsen, 2000](#)) and ([McCormick, 2009](#)), meat tenderness decreases in two distinct phases, the first from 40 to 50°C and the second from 60 to 80°C with a significant increase between 50 and 60°C. Furthermore, ([Tørnberg, 2005](#); [Wulf, Morgan, Tatum, & Smith, 1996](#)) reported that collagen solubilisation occurs with increasing temperatures above 55°C and ([Tørnberg, 2005](#)) hypothesized that above 65°C, elasticity increases, reducing tenderness. Hence, we can speculate that irrespective of animal type, cooking meat above 55°C reduces tenderness due to increased elasticity, despite solubilisation of collagen.

The higher juiciness scores at 55°C than at 74°C were also reported by the previous cited studies and many others ([Bowers, Dikeman, Murray, & Stroda, 2012](#); [Gomes, Pflanzner, Cruz, de Felício, & Bolini, 2014](#); [Martens et al., 1982](#)). For example, beef cooked to a rare endpoint temperature (< 60°C) tends to be more tender and juicy than meat cooked to a well-done endpoint (> 70°C) ([Bowers, Craig, Kropf, & Tucker, 1987](#); [Obuz & Dikeman, 2003](#)). Meat juiciness plays a key role in meat texture and refers to the mouthfeel of the moisture released during mastication. Thus, juiciness is indicative of the moisture content in meat released during chewing and from saliva in response to lipid stimulation ([Savell et al., 1989](#)). Warner's team

recently suggested that water acts as a plasticizer of muscle proteins and its loss influences structural properties by increasing the stiffness and hardness of the cooked meat ([Hughes, Oiseth, Purslow, & Warner, 2014](#)). Water is lost from the myofibrillar lattice structure as a result of protein denaturation and contraction of muscle structures by increasing cooking temperature. In addition, ([Aaslyng, Meinert, Bejerholm, & Warner, 2014](#)) postulated that the major juiciness loss is a result of actin denaturation. ([Martens et al., 1982](#)) proposed the possibility of the thermally induced protein-protein aggregation of actin in the myofibrils to expel water from the myofibril, either by reducing the water binding capacity of the native gel-like structure in the myofibril, or by contraction of the myofibrils, resulting from the formation of new aggregation cross links.

4.1.2. Beef flavour, abnormal beef flavour and overall liking

The effect of cooking temperature on beef flavour, abnormal flavour and overall liking was less pronounced than on tenderness and juiciness. As also indicated by our results, beef flavour is an important component of the overall acceptability of meat. It is a complex sensory attribute, influenced by a variety of factors and much research has focused on understanding its chemistry ([Mottram, 1998](#)). The effect of cooking temperature on the interaction between temperature and volatile components depends on the range of end-point temperatures used and the nature of the protein ([Mottram, 1998](#)). Our findings are in agreement with various studies with panellists from the USA showing higher beef flavour scores when meat is cooked well done (temperatures > 70°C) compared to very rare or rare (temperatures < 60°C) ([Cross et al., 1976](#); [Savell et al., 1999](#)). The low beef flavour scores in meat grilled at low temperature are in agreement with the strong contribution of volatile compounds generated at high temperatures to meat flavour ([Mottram, 1998](#)). Despite this, ([Bowers et al., 1987](#)) found highest flavour scores at lower (55 – 60°C) cooking temperatures. One explanation of the latter result is that beef flavour may be masked, that is, its intensity is reduced due to the presence of other flavour components, for instance abnormal beef flavour, which in our study was higher after cooking at lower temperatures ([Lawless & Heymann, 2010](#)).

Overall liking scores followed similar trends as beef flavour. Overall liking or acceptability reflects the hedonic liking from the panellists: whether the meat was perceived as satisfactory, agreeable or pleasing. Only a few reports are available concerning the effect of end-point cooking temperature on the overall liking of beef meat. ([Lorenzen et al., 2005](#)) found no differences in overall acceptability of steaks cooked at end-point temperatures of 55, 60, 63, 71, 77 or 82 °C. In another study, ([Gomes, Pflanzner, Cruz, et al., 2014](#)) using two cooking

methods (oven vs. griddles) and three end-point temperatures (65, 71 and 77°C) found highest overall liking at 65°C with the griddles method and the highest overall liking at high temperatures by the oven method. Earlier studies have shown that acceptability of steaks decreased with increasing cooking temperature ([Cross et al., 1976](#)). The relationships found between cooking temperature and overall liking may be due to its effect on flavour development and consequently, on overall liking. Previous work has shown that flavour is the most important determinant of beef eating satisfaction in meat with acceptable levels of tenderness ([Killinger, Calkins, Umberger, Feuz, & Eskridge, 2004](#)). On the other hand, sensory evaluation has shown an increased intensity of browned and species-specific flavour scores as the end-point temperature of the meat increased ([Bowers et al., 1987](#)). It is believed that higher temperatures lead to more Maillard reaction products ([Elmore & Mottram, 2009](#)), therefore, at higher cooking temperatures, beef flavour intensity may be impacted simultaneously with overall liking.

Abnormal beef flavour was significantly higher either at 55°C or at 74°C depending on the country of origin of panellists. Abnormal flavour can occur because of the original meat composition (high iron content for example) or because of changes that occur during processing, cooking, or storage. The latter effects depend on the amount of lipids and fatty acids or their quality. Studies on meat products suggest that fat acts as a solvent for volatile compounds, thus delaying flavour release or its development ([Elmore & Mottram, 2009](#)). Negative effects involve rancidity due to peroxidation of polyunsaturated fatty acids and the development of rancid flavour, potentially resulting in a loss of desirable flavour compounds.

4.2. Differences and similarities between the panellists with respect to country of origin

The effect of country of origin of the panellists on the beef sensory attributes was investigated on the complete data set of young bull samples. Juiciness and overall liking scores were the highest for the UK panel whereas beef flavour was the highest for the French panel. ([Dransfield et al., 1984](#)) have shown that strong beef flavour is a positive attribute for French panellists. Tenderness was higher after cooking at 55 than 74°C, but the decrease in tenderness after cooking at 74°C was greater in the perception of UK than of French panellists.

Thus, cooking beef at lower temperatures was an advantage in terms of tenderness and juiciness for both countries, but a disadvantage in terms of beef and abnormal flavour for UK panellists and in terms of abnormal flavour for French panellists. These differences can be explained by the different habits of consumers and panellists, for instance in terms of cooking

methods, including cooking temperature. For example, in the UK, fewer consumers are likely to prefer rare steaks ([Dransfield et al., 1984](#)). Similar preferences were found for the USA ([Neely et al., 1999](#); [Savell et al., 1999](#)).

For the UK panel, overall liking was positively correlated with beef flavour and tenderness and negatively with abnormal beef flavour. The absence of correlations between overall liking and juiciness for the UK panel indicates that juiciness is not an important attribute for overall liking for this panel, in contrast to various other studies ([Calkins & Hodgen, 2007](#); [Corbin et al., 2015](#); [O'Quinn et al., 2012](#)). For the French panel, overall liking was positively correlated with beef flavour, tenderness and juiciness. Similar results were found in American and Spanish studies ([Corbin et al., 2015](#); [O'Quinn et al., 2012](#); [Savell et al., 1999](#)). Part of these associations may be explained by the halo effect, where increased juiciness increases the perception of tenderness and vice versa ([Gill et al., 2010](#); [Jenkins et al., 2011](#)). This may also explain correlations observed between tenderness and juiciness, which were stronger for the French compared to the UK panel.

Thus, for the two panels, increased ratings for flavour were associated with higher ratings for overall liking. ([Neely et al., 1998](#)) indicated that for American consumers, flavour may be as important as tenderness in determining acceptability, as both flavour and tenderness correlated similarly with overall liking of beef steaks. However, although the French panel gave higher ratings for flavour, they gave lower ratings for overall liking at both cooking temperatures. The reason may be that tenderness and juiciness had a relatively large impact on overall liking. Juiciness was also reported as one of the main reasons for pork meat liking in Sweden ([Bryhni et al., 2003](#)).

Except for one data set (the French panel with beef from young bulls cooked at 55°C), normal and abnormal beef flavour were negatively correlated. Similar findings were reported in beef ([Campo et al., 2006](#); [Gill et al., 2010](#)) and lamb meat samples ([Karamichou, Richardson, Nute, Wood, & Bishop, 2007](#)). These relationships may result from lipid-dependent mechanisms of flavour and aroma development during cooking, storage or processing ([Calkins & Hodgen, 2007](#); [Elmore & Mottram, 2009](#); [Mottram, 1998](#)).

4.3. Contribution of various sensory attributes to the regression models of overall liking

Results of the regression models show that the drivers of overall liking differ between UK and French panels in interaction with the end-point temperatures, in accordance with earlier studies ([Dransfield et al., 1984](#); [Oliver et al., 2006](#)). The prediction level of the models was

higher at 74 than 55°C except for beef from young bulls assessed by the UK panel. Texture (in fact tenderness at 55°C and juiciness at 74°C) was the main driver of overall liking only in the case of beef from young bulls assessed by the French panel.

For the samples tested by the UK panel, overall liking was explained by beef flavour, abnormal beef flavour and tenderness, except for steer samples cooked at 55°C where overall liking was explained by normal and abnormal beef flavours only. This is maybe due to the important role on flavour of intramuscular fat content higher in steers than in young bulls (data not shown). Thus, for UK panels, flavour oriented their preference in terms of overall liking. Earlier studies indicate that flavour has a large impact on acceptability if the meat is perceived as tender ([Huffman et al., 1996](#); [Killinger et al., 2004](#); [Neely et al., 1998](#); [Robbins et al., 2003](#)). Eating context may also play a role. Thus, ([Huffman et al., 1996](#)) found that 51% of consumers in a survey indicated that tenderness was the main attribute for eating satisfaction, but, when steaks were evaluated at home, flavour affected overall liking scores more than tenderness. The important role of flavour found in the present study is consistent with the earlier suggestion that flavour may be as important as tenderness in determining overall liking for fresh beef steaks ([Monson et al., 2005](#); [Mottram, 1998](#)).

Independently from animal type and end-point temperature, juiciness was not correlated with overall liking in any of the regression models of data from UK panel. These findings are consistent with a previous study, which found that juiciness was rated less important and flavour more important to consumers who preferred steaks that were well-done rather than at lower degrees of doneness ([Reicks et al., 2011](#)). Our results are in line with those of ([Glitsch, 2000](#)) who found tenderness and flavour to be the most important attributes in beef eating quality by UK consumers while juiciness had a relatively low impact.

Overall, the results indicate that for the UK panel, overall liking depends mainly on flavour and for the French panel, it depends mainly on texture (tenderness and juiciness).

5. Conclusion

Results of this study indicate that the French and the UK panellists have different perceptions of meat samples and that overall liking is constructed differently. For the French panel, overall liking was driven by texture, i.e. tenderness and juiciness, and for the UK panel, by flavour. Irrespective of animal type and origin of the panellists, tenderness and juiciness were higher at 55 °C than 74°C, indicating that cooking at a low end-point temperature

improved beef texture for panels of both countries. However, cooking at low end-point temperature presented a disadvantage in terms of beef flavour and abnormal flavour for UK panellists and in terms of abnormal flavour for French panellists. As juiciness and tenderness were the main drivers of overall liking for the French panel, cooking at lower temperatures improved overall liking. Similarly, cooking at higher temperatures improved beef flavour from the UK perspective, and consequently overall liking. For the meat of the young bulls, the effect of higher cooking temperatures on UK overall liking was only marginal despite its positive effects on abnormal (decrease) and normal (increase) beef flavour.

Acknowledgements

This work was part of the EU FP6 Integrated Project ProSafeBeef, contract no. FOODCT-2006-36241. Funding by the European Union is highly acknowledged with respect to animal production and laboratory analyses. We thank all people involved in animal management (for instance from INRA UERT, Theix in France as well as from experimental farms in UK and Ireland). We also thank all of the persons involved in this project for their assistance in data collection, the management and slaughtering of animals and muscle sampling. A grant from PROFAS B+ program given to M.G. is gratefully acknowledged.

Conflict of interest

The authors state that there is no conflict of interest.

References

- Aaslyng, M. D., Meinert, L., Bejerholm, C., & Warner, R. (2014). SENSORY ASSESSMENT OF MEAT. In M. Dikeman & C. Devine (Eds.), *Encyclopedia of Meat Sciences (Second Edition)* (pp. 272-279). Oxford: Academic Press.
- Bejerholm, C., Tørngren, M. A., & Aaslyng, M. D. (2014). COOKING OF MEAT | Cooking of Meat. In M. Dikeman & C. Devine (Eds.), *Encyclopedia of Meat Sciences (Second Edition)* (pp. 370-376). Oxford: Academic Press.
- Boleman, S. J., Boleman, S. L., Miller, R. K., Taylor, J. F., Cross, H. R., Wheeler, T. L., Koohmaraie, M., Shackelford, S. D., Miller, M. F., West, R. L., Johnson, D. D., & Savell, J. W. (1997). Consumer evaluation of beef of known categories of tenderness. *J Anim Sci*, 75 (6), 1521-1524.
- Bowers, J. A., Craig, J. A., Kropf, D. H., & Tucker, T. J. (1987). Flavor, Color, and Other Characteristics of Beef Longissimus Muscle Heated to Seven Internal Temperatures Between 55° and 85°C. *Journal of Food Science*, 52 (3), 533-536.
- Bowers, J. A., Dikeman, M. E., Murray, L., & Stroda, S. L. (2012). Cooked yields, color, tenderness, and sensory traits of beef roasts cooked in an oven with steam generation versus a commercial convection oven to different endpoint temperatures. *Meat Sci*, 92 (2), 97-106.
- Bryhni, E. A., Byrne, D. V., Rødbotten, M., Møller, S., Claudi-Magnussen, C., Karlsson, A., Agerhem, H., Johansson, M., & Martens, M. (2003). Consumer and sensory investigations in relation to physical/chemical aspects of cooked pork in Scandinavia. *Meat Science*, 65 (2), 737-748.
- Calkins, C. R., & Hodgen, J. M. (2007). A fresh look at meat flavor. *Meat Science*, 77 (1), 63-80.
- Campo, M. M., Nute, G. R., Hughes, S. I., Enser, M., Wood, J. D., & Richardson, R. I. (2006). Flavour perception of oxidation in beef. *Meat Science*, 72 (2), 303-311.
- Christensen, M., Purslow, P. P., & Larsen, L. M. (2000). The effect of cooking temperature on mechanical properties of whole meat, single muscle fibres and perimysial connective tissue. *Meat Sci*, 55 (3), 301-307.
- Corbin, C. H., O'Quinn, T. G., Garmyn, A. J., Legako, J. F., Hunt, M. R., Dinh, T. T., Rathmann, R. J., Brooks, J. C., & Miller, M. F. (2015). Sensory evaluation of tender beef strip loin steaks of varying marbling levels and quality treatments. *Meat Sci*, 100 (0), 24-31.
- Cross, H. R., Stanfield, M. S., & Koch, E. J. (1976). Beef Palatability as Affected by Cooking Rate and Final Internal Temperature¹. *J. Anim. Sci.*, 43 (1), 114-121.
- Dransfield, E., Nute, G. R., Roberts, T. A., Boccard, R., Touraille, C., Buchter, L., Casteels, M., Cosentino, E., Hood, D. E., Joseph, R. L., Schon, I., & Paardekooper, E. J. C. (1984). Beef quality assessed at European research centres. *Meat Science*, 10 (1), 1-20.
- Dubost, A., Micol, D., Picard, B., Lethias, C., Andueza, D., Bauchart, D., & Listrat, A. (2013). Structural and biochemical characteristics of bovine intramuscular connective tissue and beef quality. *Meat Sci*, 95 (3), 555-561.
- Elmore, J., & Mottram, D. (2009). Flavour development in meat. *Improving the sensory and nutritional quality of fresh meat*, 111-146.
- Gagaoua, M., Micol, D., Hocquette, J. F., Moloney, A., Nuernberg, K., Bauchart, D., Scollan, N., Richardson, R. I., Boudjellal, A., & Picard, B. (2013). Effect of diets on bovine muscle composition and sensory quality characteristics. In *Book of Abstracts of the 64th Annual Meeting of the European Federation for Animal Science*, 26-30 of August, (Vol. 19, pp. 567). Nantes, France,: Wageningen Academic Publishers.

- Gagaoua, M., Micol, D., Richardson, R. I., Hocquette, J. F., Terlouw, E. M. C., Météau, K., Juin, H., Moloney, A. P., Nuernberg, K., Scollan, N. D., Boudjellal, A., & Picard, B. (2013). Relationships between overall liking score and sensory meat attributes in different types of beef cattle. In *Proceedings of the 59th International Congress of Meat Science and Technology* (pp. 4). Izmir, Turkey.
- Gill, J. L., Matika, O., Williams, J. L., Worton, H., Wiener, P., & Bishop, S. C. (2010). Consistency statistics and genetic parameters for taste panel assessed meat quality traits and their relationship with carcass quality traits in a commercial population of Angus-sired beef cattle. *Animal*, 4 (1), 1-8.
- Glitsch, K. (2000). Consumer perceptions of fresh meat quality: cross-national comparison. *British Food Journal*, 102 (3), 177-194.
- Gomes, C. L., Pflanzner, S. B., Cruz, A. G., de Felício, P. E., & Bolini, H. M. A. (2014). Sensory descriptive profiling and consumer preferences of beef strip loin steaks. *Food Research International*, 59 (0), 76-84.
- Gomes, C. L., Pflanzner, S. B., de Felício, P. E., & Bolini, H. M. A. (2014). Temporal changes of tenderness and juiciness of beef strip loin steaks. *LWT - Food Science and Technology*, 59 (2), 629-634.
- Grunert, K. G., Bredahl, L., & Brunsø, K. (2004). Consumer perception of meat quality and implications for product development in the meat sector—a review. *Meat Science*, 66 (2), 259-272.
- Hocquette, J. F., Botreau, R., Picard, B., Jacquet, A., Pethick, D. W., & Scollan, N. D. (2012). Opportunities for predicting and manipulating beef quality. *Meat Sci*, 92 (3), 197-209.
- Huffman, K. L., Miller, M. F., Hoover, L. C., Wu, C. K., Brittin, H. C., & Ramsey, C. B. (1996). Effect of beef tenderness on consumer satisfaction with steaks consumed in the home and restaurant. *J Anim Sci*, 74 (1), 91-97.
- Hughes, J. M., Oiseth, S. K., Purslow, P. P., & Warner, R. D. (2014). A structural approach to understanding the interactions between colour, water-holding capacity and tenderness. *Meat Sci*, 98 (3), 520-532.
- Jenkins, K. H., Vasconcelos, J. T., Hinkle, J. B., Furman, S. A., de Mello, A. S., Jr., Senaratne, L. S., Pokharel, S., & Calkins, C. R. (2011). Evaluation of performance, carcass characteristics, and sensory attributes of beef from finishing steers fed field peas. *J Anim Sci*, 89 (4), 1167-1172.
- Jeremiah, L. E., & Gibson, L. L. (2003). The effects of postmortem product handling and aging time on beef palatability. *Food Research International*, 36 (9-10), 929-941.
- Joseph, J. K., Awosanya, B., Adeniran, A. T., & Otagba, U. M. (1997). The effects of end-point internal cooking temperatures on the meat quality attributes of selected Nigerian poultry meats. *Food Quality and Preference*, 8 (1), 57-61.
- Karamichou, E., Richardson, R. I., Nute, G. R., Wood, J. D., & Bishop, S. C. (2007). Genetic analyses of sensory characteristics and relationships with fatty acid composition in the meat from Scottish Blackface lambs. *Animal*, 1 (10), 1524-1531.
- Killinger, K. M., Calkins, C. R., Umberger, W. J., Feuz, D. M., & Eskridge, K. M. (2004). Consumer sensory acceptance and value for beef steaks of similar tenderness, but differing in marbling level. *J Anim Sci*, 82 (11), 3294-3301.
- Lawless, H. T., & Heymann, H. (2010). *Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices*: Springer.
- Lorenzen, C. L., Davuluri, V. K., Adhikari, K., & Grün, I. U. (2005). Effect of End-point Temperature and Degree of Doneness on Sensory and Instrumental Flavor Profile of Beefsteaks. *Journal of Food Science*, 70 (2), S113-S118.
- Lorenzen, C. L., Miller, R. K., Taylor, J. F., Neely, T. R., Tatum, J. D., Wise, J. W., Buyck, M. J., Reagan, J. O., & Savell, J. W. (2003). Beef Customer Satisfaction: Trained

- sensory panel ratings and Warner-Bratzler shear force values¹. *J Anim Sci*, 81 (1), 143-149.
- Maher, S. C., Mullen, A. M., Moloney, A. P., Buckley, D. J., & Kerry, J. P. (2004). Quantifying the extent of variation in the eating quality traits of the M. longissimus dorsi and M. semimembranosus of conventionally processed Irish beef. *Meat Sci*, 66 (2), 351-360.
- Martens, H., Stabursvik, E., & Martens, M. (1982). Texture and Colour Changes in Meat during Cooking Related to Thermal Denaturation of Muscle Proteins. *Journal of Texture Studies*, 13 (3), 291-309.
- McCormick, R. (2009). Collagen. *Applied Muscle Biology and Meat Science*. M. Du and R.J. McCormick, ed. CRC Press, New York, NY, 129-148.
- Miller, M. F., Carr, M. A., Ramsey, C. B., Crockett, K. L., & Hoover, L. C. (2001). Consumer thresholds for establishing the value of beef tenderness. *J Anim Sci*, 79 (12), 3062-3068.
- Monson, F., Sanudo, C., & Sierra, I. (2005). Influence of breed and ageing time on the sensory meat quality and consumer acceptability in intensively reared beef. *Meat Sci*, 71 (3), 471-479.
- Mortensen, L. M., Frøst, M. B., Skibsted, L. H., & Risbo, J. (2012). Effect of Time and Temperature on Sensory Properties in Low-Temperature Long-Time Sous-Vide Cooking of Beef. *Journal of Culinary Science & Technology*, 10 (1), 75-90.
- Mottram, D. S. (1998). Flavour formation in meat and meat products: a review. *Food Chemistry*, 62 (4), 415-424.
- Neely, T. R., Lorenzen, C. L., Miller, R. K., Tatum, J. D., Wise, J. W., Taylor, J. F., Buyck, M. J., Reagan, J. O., & Savell, J. W. (1998). Beef customer satisfaction: role of cut, USDA quality grade, and city on in-home consumer ratings. *J Anim Sci*, 76 (4), 1027-1033.
- Neely, T. R., Lorenzen, C. L., Miller, R. K., Tatum, J. D., Wise, J. W., Taylor, J. F., Buyck, M. J., Reagan, J. O., & Savell, J. W. (1999). Beef customer satisfaction: cooking method and degree of doneness effects on the top round steak. *J Anim Sci*, 77 (3), 653-660.
- O'Quinn, T. G., Brooks, J. C., Polkinghorne, R. J., Garmyn, A. J., Johnson, B. J., Starkey, J. D., Rathmann, R. J., & Miller, M. F. (2012). Consumer assessment of beef strip loin steaks of varying fat levels. *J Anim Sci*, 90 (2), 626-634.
- Obuz, E., & Dikeman, M. E. (2003). Effects of cooking beef muscles from frozen or thawed states on cooking traits and palatability. *Meat Science*, 65 (3), 993-997.
- Oliver, M. A., Nute, G. R., Font, I. F. M., San Julian, R., Campo, M. M., Sanudo, C., Caneque, V., Guerrero, L., Alvarez, I., Diaz, M. T., Branscheid, W., Wicke, M., & Montossi, F. (2006). Eating quality of beef, from different production systems, assessed by German, Spanish and British consumers. *Meat Sci*, 74 (3), 435-442.
- Platter, W. J., Tatum, J. D., Belk, K. E., Koontz, S. R., Chapman, P. L., & Smith, G. C. (2005). Effects of marbling and shear force on consumers' willingness to pay for beef strip loin steaks. *J Anim Sci*, 83 (4), 890-899.
- Purslow, P. P. (2014). New developments on the role of intramuscular connective tissue in meat toughness. *Annu Rev Food Sci Technol*, 5, 133-153.
- Reicks, A. L., Brooks, J. C., Garmyn, A. J., Thompson, L. D., Lyford, C. L., & Miller, M. F. (2011). Demographics and beef preferences affect consumer motivation for purchasing fresh beef steaks and roasts. *Meat Science*, 87 (4), 403-411.
- Robbins, K., Jensen, J., Ryan, K. J., Homco-Ryan, C., McKeith, F. K., & Brewer, M. S. (2003). Consumer attitudes towards beef and acceptability of enhanced beef. *Meat Sci*, 65 (2), 721-729.

- Savell, J. W., Cross, H. R., Francis, J. J., Wise, J. W., Hale, D. S., Wilkes, D. L., & Smith, G. C. (1989). National Consumer Retail Beef Study: Interaction of Trim Level, Price and Grade on Consumer Acceptance of Beef Steaks and Roasts. *Journal of Food Quality*, 12 (4), 251-274.
- Savell, J. W., Lorenzen, C. L., Neely, T. R., Miller, R. K., Tatum, J. D., Wise, J. W., Taylor, J. F., Buyck, M. J., & Reagan, J. O. (1999). Beef customer satisfaction: cooking method and degree of doneness effects on the top sirloin steak. *J Anim Sci*, 77 (3), 645-652.
- Tornberg, E. (2005). Effects of heat on meat proteins - Implications on structure and quality of meat products. *Meat Sci*, 70 (3), 493-508.
- Verbeke, W., Van Wezemael, L., de Barcellos, M. D., Kugler, J. O., Hocquette, J. F., Ueland, O., & Grunert, K. G. (2010). European beef consumers' interest in a beef eating-quality guarantee Insights from a qualitative study in four EU countries. *Appetite*, 54 (2), 289-296.
- Wulf, D. M., Morgan, J. B., Tatum, J. D., & Smith, G. C. (1996). Effects of animal age, marbling score, calpastatin activity, subprimal cut, calcium injection, and degree of doneness on the palatability of steaks from limousin steers. *J Anim Sci*, 74 (3), 569-576.

Table 1

Numbers of *Longissimus thoracis* beef samples assessed by the two sensory panels from the United Kingdom (UK) and from France (FR) at two end-point cooking temperatures (55 and 74°C)

Gender	Breeds	Panel from United Kingdom (UK)		Panel from France (FR)	
		55°C	74°C	55°C	74°C
Young bulls	AA	24	24	24	24
	Li	25	25	25	25
	BA	25	25	25	25
Steers	CHx	16	32	-	-
	BH	40	40	-	-
Heifers	AF	47	47	-	-
	BF	47	47	-	-

Abbreviations: young bulls (AA: Aberdeen Angus, Li: Limousin, BA: Blond d'Aquitaine); Heifers (AF: Aberdeen Angus x Friesian, BF: Belgian-Blue x Friesian), and Steers (BH: Belgian-Blue x Holstein, CHx: Charolais cross-bred). Beef samples indicated by (-) were unevaluated.

Table 2

Effect of cooking temperature on beef sensory attributes of steers and heifers assessed by the UK panel at two end-point cooking temperatures (55 and 74°C) ^a

Attributes ^b	Cooking temperature		SEM ^c	P-value ^d
	55 °C	74°C		
Steers				
Tenderness	6.40	5.79	0.08	***
Juiciness	7.17	6.08	0.08	***
Beef flavour	5.40	6.13	0.06	***
Abnormal flavour	3.81	3.37	0.05	***
Overall liking	4.51	6.35	0.11	***
Heifers				
Tenderness	6.51	5.73	0.06	***
Juiciness	7.40	6.57	0.05	***
Beef flavour	5.17	5.45	0.03	***
Abnormal flavour	3.00	2.68	0.03	***
Overall liking	4.27	4.53	0.05	*

^a Data used correspond to steers and heifers (as in Table 1) for beef samples assessed by panellists from the United Kingdom at 55 and 74°C.

^b LSmeans of each attribute (scored from 0 to 10).

^c Standard error of mean

^d Significance level: * $P < 0.05$; ***: $P < 0.0001$.

Table 3

Effect of sensory panel (from UK and France (FR)), cooking temperature and interaction on beef sensory attributes of young bulls assessed at two end-point cooking temperatures (55 and 74°C) ^a

Attributes ^b	Panel from UK		Panel from FR		SEM ^d	P-values ^e	
	55°C	74°C	55°C	74°C		Panel	Temp
Tenderness ^c	4.93 ^a	3.80 ^c	4.90 ^a	4.29 ^b	0.06	Ns	***
Juiciness	6.50 ^a	4.58 ^b	4.73 ^b	3.62 ^c	0.07	***	***
Beef flavour	2.69 ^c	3.21 ^b	3.99 ^a	3.86 ^a	0.05	***	*
Abnormal flavour	3.04 ^a	2.54 ^b	2.33 ^b	3.05 ^a	0.04	ns	***
Overall liking	3.37 ^a	3.49 ^a	2.76 ^b	2.35 ^c	0.05	***	ns

^a Data used correspond to young bulls *i.e.* AA, Li and BA (as in Table 1) at the both panels and temperatures.

^b L Smeans of each attribute (scored from 0 to 10).

^c Within a beef sensory attribute, least square means with a common superscript are not significantly different: $P < 0.05$.

^d Standard error of mean

^e Significance level: ns: not significant ; * $P < 0.05$; ***: $P < 0.0001$.

Table 4

Regression model R-squares values for overall liking explanation following a stepwise regression performed on the pooled within-animal type Z-scores ^a

Country panel	Genders	Cooking temperature	Explanatory variables ^b			adj. R ²	RMSE	AIC	Equations ^d
			1 ^c	2	3				
United Kingdom	Heifers	55°C	BF (0.32 ^b) ***	GT (0.12) ***	ABF (0.05) **	0.49	0.72	-58	= 0.42 · BF + 0.35 · GT – 0.25 · ABF
		74°C	BF (0.41) ***	GT (0.13) ***	ABF (0.13) ***	0.67	0.58	-99	= 0.43 · BF + 0.40 · GT – 0.37 · ABF
	Steers	55°C	ABF (0.27) *	BF (0.06) *	-	0.33	0.94	-4.3	= 0.30 · BF – 0.36 · ABF
		74°C	BF (0.43) **	GT (0.05) **	ABF (0.05) **	0.53	0.69	-50	= 0.41 · BF + 0.26 · GT – 0.34 · ABF
	Young bulls	55°C	ABF (0.65) ***	GT (0.06) ***	BF (0.06) **	0.77	0.48	-102	= 0.32 · BF + 0.25 · GT – 0.55 · ABF
		74°C	ABF (0.46) ***	GT (0.19) ***	BF (0.03) *	0.68	0.57	-77	= 0.21 · BF + 0.41 · GT – 0.45 · ABF
France	Young bulls	55°C	GT (0.37) ***	BF (0.17) ***	JUIC (0.03) *	0.57	0.67	-55	= 0.39 · BF + 0.43 · GT + 0.17 · JUIC
		74°C	JUIC (0.49) ***	BF (0.10) ***	GT (0.03) *	0.62	0.63	-63	= 0.29 · BF + 0.24 · GT + 0.42 · JUIC

Abbreviations: adj. R²: adjusted R-square; RMSE: root-mean-square error; AIC: Akaike information criterion; GT: global tenderness; JUIC: juiciness; BF: beef flavour; ABF: abnormal flavour.

^a The overall liking explanation models of data from heifers, steers and bulls (as in Table 1) were performed using the pooled within-breed Z-scores : $Z = \frac{x - \mu}{\sigma}$ where μ is the mean of the population and σ is the standard deviation of the population.

^b The explanatory variables are in order of their entering in the models

^c Significance level of the entered variables in the model: * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$; *** $P < 0.0001$.

^d All prediction models are highly significant ($P < 0.0001$).

^e Partial R-square.

Figure captions

Figure 1

Pearson correlation coefficients performed on the pooled within-animal type Z-scores of all animals types for sensory scores evaluated by panellists from UK at 55 and 74°C. The solid and dotted lines correspond to positive and negative correlations respectively. *Significance*: t $P < 0.05$; * $P < 0.01$; ** $P < 0.001$; *** $P < 0.0001$.

Figure 2

Pearson correlation coefficients performed on the pooled within-animal type Z-scores of young bulls for sensory scores evaluated by **a)** panellists from UK and **b)** from France at 55 and 74°C. The solid and dotted lines correspond to positive and negative correlations respectively. *Significance*: t $P < 0.05$; * $P < 0.01$; ** $P < 0.001$; *** $P < 0.0001$.

Figure 3

Principal component analyses (PCA).

a) PCA performed on the pooled within-animal type Z-scores of all animal types ($n = 240$) evaluated by panellists from UK at 55°C (Δ) and 74°C ($\blacktriangle$) as indicated in Table 1. The overall Kaiser's Measure of Sampling Adequacy (MSA) found is 0.67. **b)** PCA performed on the pooled within-animal type Z-scores showing relationships between sensory scores evaluated by panellists from UK (Δ) and France ($\circ$) at 55°C (white markers) and 74°C (gray markers). Data used correspond to all young bulls *i.e.* AA, Li and BA as indicated in Table 1. The overall MSA found is 0.70. *Abbreviations*: GT: global tenderness; JUIC: juiciness; BF: beef flavour; ABF: abnormal flavour.

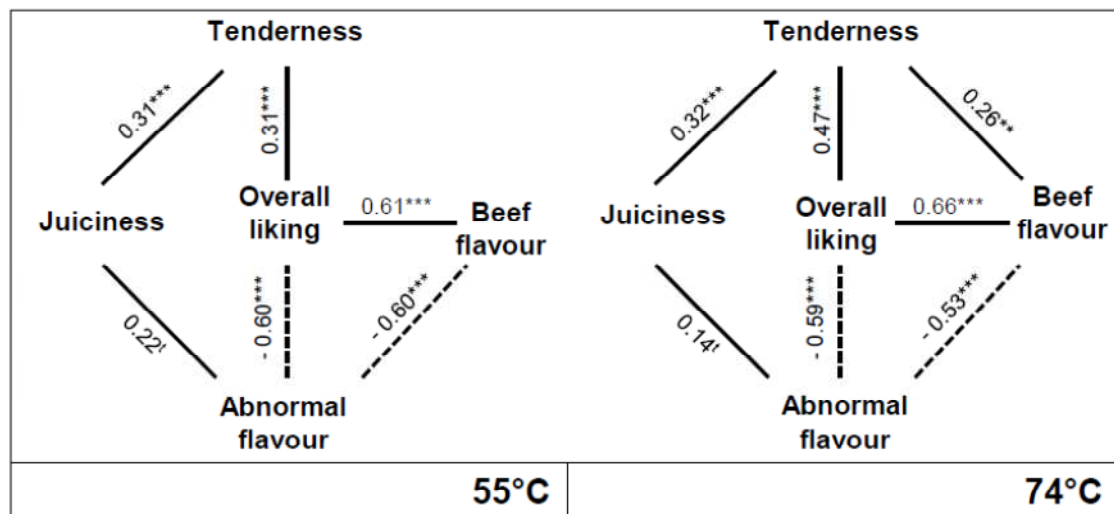


Figure 1

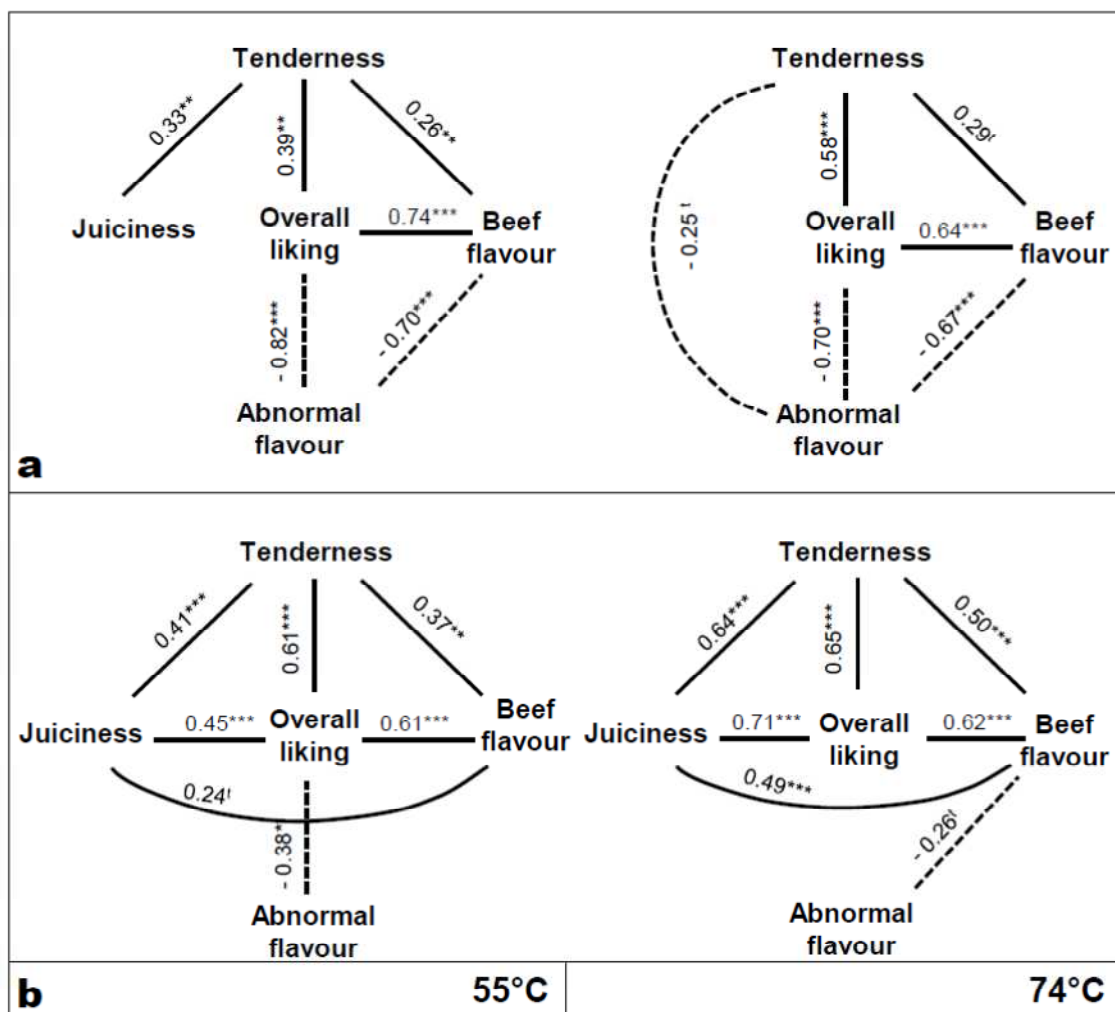


Figure 2

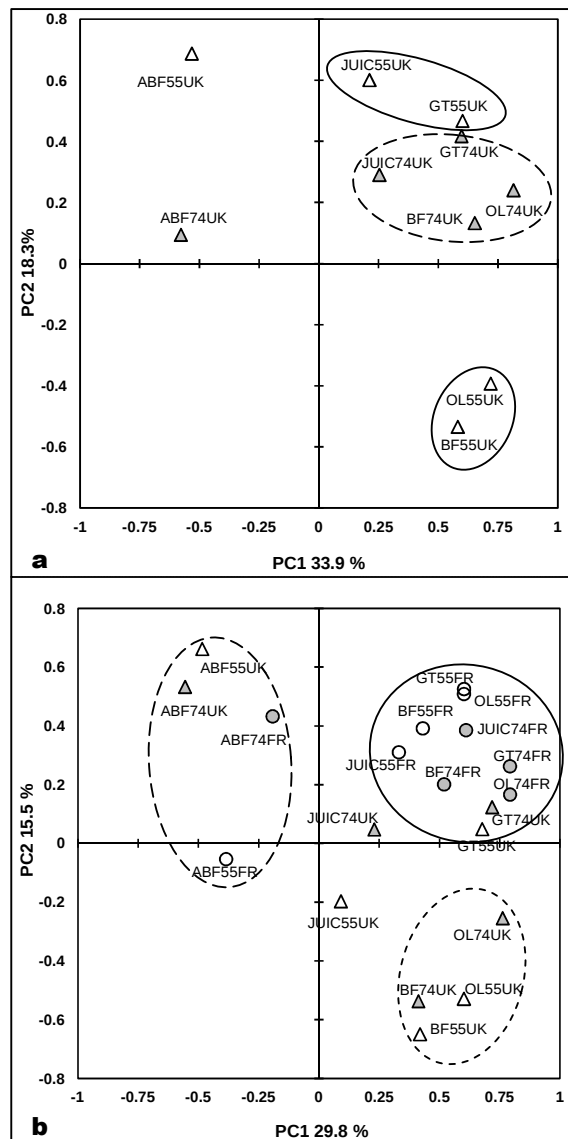


Figure 3

Supplément publication n°01

Supplément publication n° 01

Relationships between overall liking score and sensory meat attributes in different types of beef cattle

M. Gagaoua, D. Micol, R.I. Richardson, J.F. Hocquette, E.M.C. Terlouw, K. Météau, H. Juin, A.P. Moloney, K. Nuernberg, N.D. Scollan, A. Boudjellal, B. Picard

Publié dans proceeding of 59th ICoMST 2013, Izmir-Turquie (ISBN: 978-605-125-720-4)

Résumé :

Une meilleure compréhension et un contrôle de la qualité sensorielle de la viande est un objectif majeur pour la filière viande. La qualité sensorielle de la viande bovine est très variable et dépend de nombreux facteurs interdépendants pré et post-abattage. La qualité finale de la viande perçue par les consommateurs dépend de l'appréciation globale et de leurs préférences individuelles. Ces critères dépendent des réponses sensorielles individuelles lors de la consommation de la viande, tels que la perception de la tendreté, la jutosité et la flaveur. De nombreuses études indiquent que l'appréciation globale de la viande implique plusieurs attributs sensoriels et que les relations trouvées sont variables selon les races ou muscles considérés. La présente étude vise à mieux comprendre la contribution des différents attributs sensoriels sur l'appréciation globale de la viande bovine d'animaux de race et sexe différents. Elle vise donc à expliquer et prédire les notes de l'appréciation globale. Pour atteindre nos objectifs, un effectif de 248 animaux (bœufs, taurillons et génisses) de 8 races différentes ou de races croisées a été étudié. Les échantillons du muscle *Longissimus thoracis* grillés à 55°C ont été évalués par un jury sensoriel entraîné. Les analyses de régression multiples ont montré que 27% de la variabilité de l'appréciation globale de la viande de bœufs après 10 jours de maturation s'explique par les notes de la flaveur anormale. Pour la viande de génisses après 10 jours de maturation, 51% de la variabilité s'explique par la tendreté, la jutosité, la flaveur normale et anormale. Pour la viande de taurillons après 14 jours de maturation, 75% de l'appréciation globale s'explique par la tendreté, la flaveur normale et anormale, ainsi qu'un effet race prononcé. Parmi les caractéristiques musculaires analysées, seule l'activité de la citrate synthase est capable d'expliquer une partie de l'appréciation globale chez les jeunes taurillons. Les résultats de cette étude montrent que, pour comprendre les contributions relatives des divers attributs sensoriels sur l'appréciation globale, il est nécessaire de prendre en compte l'effet sexe ou d'autres facteurs liés à l'animal.

Mots clés : Bovin; qualités sensorielles de la viande; panel de dégustation ; appréciation globale.

RELATIONSHIPS BETWEEN OVERALL LIKING SCORE AND SENSORY MEAT ATTRIBUTES IN DIFFERENT TYPES OF BEEF CATTLE

M. Gagaoua^{1,2}, D. Micol¹, R.I. Richardson³, J-F. Hocquette¹, C. Terlouw¹, K. Meteau⁴, H. Juin⁴, A.P. Moloney⁵, K. Nuernberg⁶, N.D. Scollan⁷, A. Boudjellal² and B. Picard¹

¹ INRA, VetAgro Sup, UMR1213 Herbivores, 63122 St-Genès-Champagnelle, France

² INATAA, Constantine 1 University, Route de Ain El-Bey 25000, Algeria

³ Division of Farm Animal Science, University of Bristol, Langford, Bristol, BS40 5DU, United Kingdom

⁴ INRA, UE1206, Elevage Alternatif et Santé Animale, Le Magneraud, F-17700 Saint Pierre d'Amilly, France

⁵ Teagasc, Animal and Grassland Research and Innovation Centre, Grange, Dunsany, Co. Meath, Ireland

⁶ FBN Leibniz Institute for Farm Animal Biology, W-Stahl-Allee 2, 18196 Dummerstorf, Germany

⁷ Institute of Biological, Environmental and Rural Sciences, Aberystwyth University, Gogerddan, SY23 3EB, United Kingdom

Abstract – This study aimed to explain overall liking score. It investigated sensory meat qualities of 248 animals (steers, young bulls and heifers) of 8 different breeds or cross breeds finished in France, Germany, Ireland and UK were investigated. Samples from *Longissimus* muscle aged for 10 or 14 days and cooked at 55 °C were rated by sensory panels in France (French and German animals) and UK (British and Irish animals). Regression analyses showed that 27% of the variability in overall liking of beef aged 10 days from steers could be explained by the scores for abnormal beef flavour. For beef aged 10 days from heifers, 51% of the variability in overall liking could be explained in terms of tenderness, juiciness, beef flavour and abnormal beef flavour. For beef aged 14 days from bulls, 75% of the overall liking could be explained by tenderness, beef flavour and abnormal beef flavour scores as well as by breed. Among muscle characteristics analysed, only citrate synthase activity explained a part of overall liking in young bulls from France and Germany. The results from this study show that to understand the relative contributions of various sensory attributes to overall liking it is necessary to take into account the gender or other aspects of the animal type, and possibly also the laboratory and protocol relative to sensory analysis.

Key Words – beef, meat qualities, sensory panel

I. INTRODUCTION

A better understanding and control of beef sensory quality is a major research objective. Beef sensory

quality is very variable and depends on many interacting factors before and after slaughter. The perceived overall quality of meat depends on the overall liking and the individual preferences of consumers. Both criteria depend on the individual sensory responses during meat consumption, including perception of tenderness, juiciness, and flavour [1]. Other studies indicate that overall liking of beef may involve several sensory attributes and that the exact relationships vary across studies comparing different breeds [2, 3] or muscles [4, 5]. The present study aimed to increase our understanding of the contribution of various sensory attributes to the overall liking of beef from different breeds, gender and finished in different European countries. The study is part of the ProSafeBeef project (www.prosafebeef.eu) [6].

II. MATERIALS AND METHODS

Two hundred and forty-eight animals were studied in four experiments in four European countries, including young bulls, steers and heifers. Bull breeds were Limousin (LIM; n=25), Blond d'Aquitaine (BA; n=25) and Aberdeen Angus (AA; n=24), finished in France and Holstein (HO; n=25) finished in Germany. Heifers were Belgian-Blue x Friesian (BF; n=47) and Angus x Friesian (AF; n=47) finished in Ireland. Steers were Belgian-Blue x Holstein (BH; n=40) and a Charolais crossbred (CH; n=16) finished in the UK. Studies complied with welfare regulations of each country.

After slaughter under standard conditions in either commercial or experimental slaughterhouses in each country, the carcasses were chilled and stored at 4 °C until 24 h *postmortem*. *Longissimus thoracis* muscle was excised from the right side of each carcass. The loins of the carcasses were divided into different parts for sensory analysis. Muscles for sensory analysis were cut into steaks and placed in sealed plastic bags under vacuum and kept between 2–4°C for 14 days (bulls from France and Germany and heifers from Ireland) or 10 days (steers from UK) for ageing. Subsequently, the samples were trimmed, vacuum-packed and frozen individually at -20°C until sensory analysis. German and French samples were assessed for sensory scores in France (Le Magneraud). Irish and British samples were assessed for sensory scores in UK (Bristol). The same protocol was used in both laboratories. Forty hours before the analysis, samples were thawed and placed in a refrigerator at 4–5°C. The morning of the analysis, the meat samples were cut into two 1.50 cm steaks and grilled between two contact plates heated to 310°C. Steaks were heated for 2 min between two aluminium sheets, until the end-point temperature of 55°C was reached. After grilling, each steak was cut into 6 portions which were presented to 12 panellists trained in meat sensory analysis. The panellists rated the steaks for global tenderness (GT), juiciness (JUIC), beef flavour intensity (BF), abnormal flavour intensity (ABF), and overall liking (OL), on a 0 to 10 unstructured scale. The sessions were carried out in a sensory analysis room equipped with individual boxes under artificial non-coloured lighting. The FIZZ program (Fizz v 2.20h, Biosystemes, Couternon, France) was used for data entry, formatted on Excel.

Glycolytic (PFK, phosphofructokinase and LDH, lactate dehydrogenase) and oxidative (ICDH, isocitrate dehydrogenase, CS, citrate synthase and COX, cytochrome c oxydase) enzyme activities were assayed as in [7] and muscle fibre properties were quantified as described by [8].

Statistical analysis used SAS 9.2 and XLSTAT 2009 software and was based on Principal Component Analysis (PCA), involving all sensory attributes and multiple regression analyses in order to explain overall liking scores in terms of the other sensory attributes and animal type effects. The regression analyses selected best models using

the option 'optimal model, maximal 5 variables' in terms of % of variability explained. The introduction of muscle fibres characteristics into the models was also tested. The GLM method was used to compare sensory attributes between animal types and loadings on the first and second principal axis between breeds/genders/countries.

III. RESULTS AND DISCUSSION

Sensory attributes of each group of animals are presented in Table 1. The PCA explained 84% of the variability between animals in sensory attributes (Figure 1a). Abnormal beef flavour loaded positively on the 2nd axis (PC 2 = 15%) and the remaining attributes positively on the 1st (PC 1 = 69%). Beef steaks from heifers and steers scored higher ($p<0.0001$) on the 1st axis than beef aged 14 days from bulls (Figure 1b). Beef aged 10 days from steers scored higher ($P<0.0001$) on the 2nd axis than from heifers (Figures 1a, b).

Within steers, CH had higher ($P<0.01$) scores for global tenderness, juiciness and beef flavour and lower ($P<0.0001$) scores for abnormal beef flavour. Within young bulls, AA had higher ($P=0.05$) scores for tenderness than HO. AA and HO had higher ($P<0.01$) scores for beef flavour and overall liking than LIM while BA had the lowest ($P<0.01$) scores. AA had lower ($P<0.001$) scores for abnormal beef flavour than the other breeds. Within heifers, no significant breed effects were found.

Table 1. Animal group (breed/gender/ageing time/country) effect on meat sensory attributes.

Sensory scores for different beef type (Country of rearing/ageing time/gender)					
Country of origin				SEM	P-value
	Ireland	UK	France, Germany		
Ageing time and sensory analysis location	14 days UK	10 days UK	14 days France		
Gender	Heifers	Steers	Bulls		
Attributes					
GT	6.5 ^a	6.4 ^a	4.8 ^b	0.06	***
JUIC	7.4 ^a	7.2 ^b	4.7 ^c	0.08	***
BF	5.2 ^b	5.4 ^a	4.1 ^c	0.04	***
ABF	3.0 ^b	3.8 ^a	2.4 ^c	0.03	***
OL	4.3 ^b	5.6 ^a	2.9 ^c	0.06	***

On a same line, different superscripts indicate significant differences ($P < 0.05$).

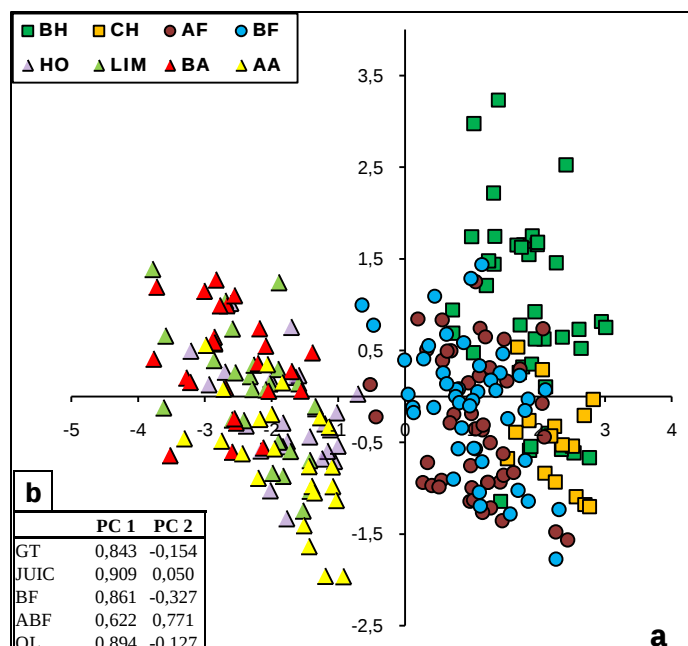


Figure 1. Principal component analysis. **a)** Plot of the individual scores of the first two principal components of the 248 animals (using different symbols for bulls (Δ , ageing time 14 days), heifers ($\circ$) and steers ($\square$, ageing time 10 days)) using all sensory attributes; **b)** PCA loadings of the sensory attributes on the 1st (PC1) and 2nd (PC2) axis explaining 84% of the variability.

Gender effects were to a large extent confounded with breed, the country of production and ageing time and to a lesser extent, to the country of sensory analyses. Differences between 10-days aged beef from heifers and steers assessed for sensory scores in UK on the one hand and 14-days beef from bulls assessed for sensory scores in France on the other hand may be related to the country of sensory analysis.

The higher scores for tenderness and juiciness and lower scores for beef flavour, abnormal flavour and overall liking of heifers compared to steers may be related to the country of experimentation, diet and/or gender.

Concerning breed effects in young bulls, cooked meat of AA and LIM had higher shear values than CH, while HO had intermediate values [9]. An earlier study found no differences in tenderness or flavour, but higher juiciness in LIM compared to AA or CH [10].

As gender, ageing time and country of the experiment had a large impact on the sensory attributes, the regression analyses were carried out

for each gender separately, while taking into account breed effects where relevant.

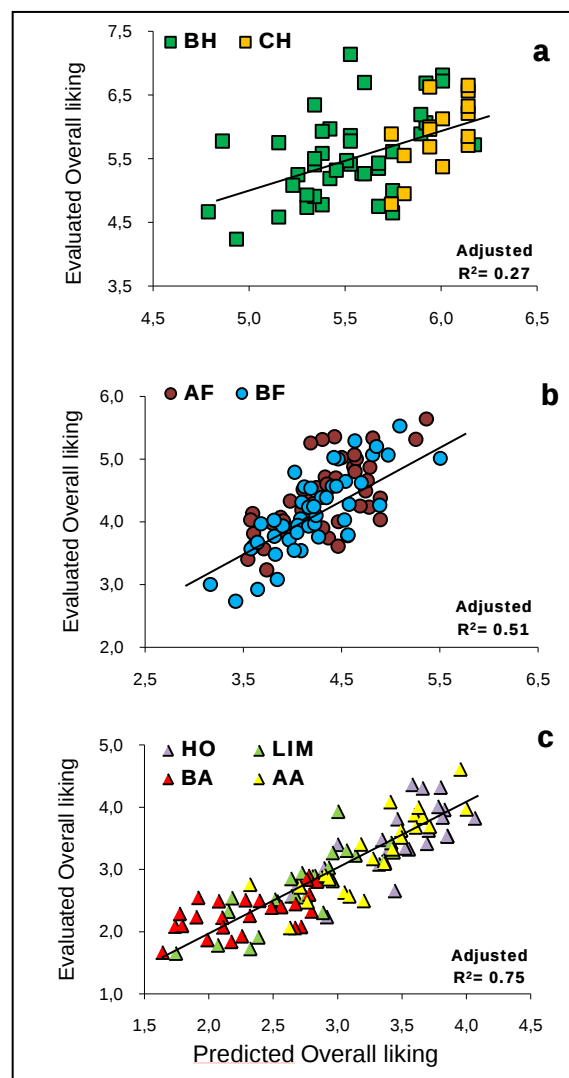


Figure 2. Correlations between predicted and measured overall liking scores for steers **(a)**, heifers **(b)** and bulls **(c)**. Prediction equations used were: Overall Liking = $7.7 - 0.5 * ABF$ (steers); $= -0.4 + 0.2 * TG + 0.2 * JUIC + 0.6 * BF - 0.4 * ABF$ (heifers), and $= -0.2 + 0.4 * TG + 0.5 * BF - 0.3 * ABF + 0.2 * AA \text{ breed} - 0.3 * BA \text{ breed} + 0.6 * HO \text{ breed}$ (bulls).

Results show (Figure 2a) that 27% of the variability in overall liking (OL) in steers could be explained by the scores for abnormal beef flavour. In heifers, 51% of the variability in OL could be explained in terms of tenderness, juiciness, beef flavour and abnormal beef flavour. In bulls, 75% of the OL could be explained by tenderness, beef flavour and abnormal beef flavour scores as well as breed effects.

When muscle characteristics were introduced into the models, only CS was significant and only in young bulls, and the model obtained had less predictive power ($OL = 2.2 + 0.1 * CS + 0.6 * AA \text{ breed} - 0.4 * BA \text{ breed} + 0.8 * HO \text{ breed}$; 45% of variability explained). This result may be interpreted in terms of its relationship with other muscle characteristics. It was shown that CS activity is strongly associated with genetic selection for muscle growth [11] and nutritional factors [12] compared to ICDH and LDH.

CONCLUSION

The results of this study show that to understand the relative contributions of various sensory attributes to overall liking of beef meat, it is necessary to take into account the animal type (gender, breed, age). Sensory analysis conducted in UK found that for steers, the separate sensory attributes were only weakly related to overall liking. For young bulls finished in France and Germany and analysed in France, overall liking could be predicted to a large extent from sensory attributes and breed. Heifers finished in Ireland and analysed in UK had intermediate predictability of overall liking. Use of muscle characteristics contributed little to the predictive power of the regression models. Further studies are needed to determine which breed-related characteristics contribute to the overall liking scores in young bulls. Studies are also needed to evaluate the role of protocols used, including ageing, and of differences in country-specific sensory appreciation in the differences in the results of sensory analyses between UK and France.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the EU ProSafeBeef project. The authors express sincere appreciation to numerous people of the different teams involved in this project for their assistance in data collection.

REFERENCES

1. Jeremiah, L. E., & Gibson, L. L. (2003). The effects of postmortem product handling and aging time on beef palatability. *Food Research International*, 36(9-10), 929-941.
2. Chambaz, A., Scheeder, M. R. L., Kreuzer, M., & Dufey, P. A. (2003). Meat quality of Angus,

- Simmental, Charolais and Limousin steers compared at the same intramuscular fat content. *Meat Science*, 63(4), 491-500.
3. Dransfield, E., Rhodes, D. N., Nute, G. R., Roberts, T. A., Boccard, R., Touraille, C., Buchter, L., Hood, D. E., Joseph, R. L., Schon, I., Casteels, M., Cosentino, E., *et al.* (1982). Eating quality of European beef assessed at five research institutes. *Meat Science*, 6(3), 163-184.
4. Rhee, M. S., Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., & Koohmaraie (2004). Variation in palatability and biochemical traits within and among eleven beef muscles. *J Anim Sci*, 82: 534-550.
5. Dransfield, E., Martin, J.-F., Bauchart, D., Abouelkaram, S., Lepetit, J., Culioli, J., Jurie, C., & Picard, B. (2003). Meat quality and composition of three muscles from French cull cows and young bulls. *Animal Sci*, 76, 387-399.
6. Verbeke, W., Perez-Cueto, F. J., Barcellos, M. D., Krystallis, A., & Grunert, K. G. (2010). European citizen and consumer attitudes and preferences regarding beef and pork. *Meat Sci*, 84(2), 284-292.
7. Jurie, C., Picard, B., Hocquette, J. F., Dransfield, E., Micol, D., & Listrat, A. (2007). Muscle and meat quality characteristics of Holstein and Salers cull cows. *Meat Sci*, 77(4), 459-466.
8. Picard, B., Barboiron, C., Chadeyron, D., & Jurie, C. (2011). Protocol for high-resolution electrophoresis separation of myosin heavy chain isoforms in bovine skeletal muscle. *Electrophoresis*, 32(14), 1804-1806.
9. Christensen, M., Ertbjerg, P., Failla, S., Sanudo, C., Richardson, R. I., Nute, G. R., Olleta, J. L., Panea, B., Alberti, P., Juarez, M., Hocquette, J. F., & Williams, J. L. (2011). Relationship between collagen characteristics, lipid content and raw and cooked texture of meat from young bulls of fifteen European breeds. *Meat Sci*, 87(1), 61-65.
10. Olleta, J., Sanudo, C., Monson, F., Campo, M., Panea, B., Alberti, P., Christensen, M., Ertbjerg, P., Failla, S., & Gigli, S. (2006). Sensory evaluation of several European cattle breeds. *Options méditerranéennes, series A*, 297-300.
11. Hocquette, J. F., Cassar-Malek, I., Jurie, C., Bauchart, D., Picard, B., & Renand, G. (2012). Relationships between muscle growth potential, intramuscular fat content and different indicators of muscle fibre types in young Charolais bulls. *Animal Science Journal*, 83, 750-758.
12. Cassar-Malek, I., Hocquette, J. F., Jurie, C., Listrat, A., Jailler, R., Bauchart, D., Briand, Y., & Picard, B. (2004). Muscle-specific metabolic, histochemical and biochemical responses to a nutritionally induced discontinuous growth path. *Animal Science*, 79, 49-59.

Caractéristiques musculaires et qualités sensorielles

Introduction

Les attributs sensoriels de la qualité de la viande (couleur, tendreté, flaveur et jutosité) impactent fortement les préférences et attentes des consommateurs (Dransfield *et al.*, 2003). Ces attributs sont influencés par les caractéristiques musculaires de l'animal et les modifications biochimiques *post-mortem* (Ouali 1990; Dransfield *et al.*, 2003; Jurie *et al.*, 2007). Les caractéristiques musculaires, sont par ailleurs influencées par de nombreux facteurs liés ou non à l'animal tels que la race, l'âge, le sexe et l'alimentation (Cuvelier *et al.*, 2006; Jurie *et al.*, 2006). Ces caractéristiques dépendent d'une part, des propriétés contractiles et métaboliques des différents types de fibres (type I, type IIA, type IIX et/ou type IIB) qui composent les muscles squelettiques des bovins (Picard et Cassar-Malek, 2009). D'autre part, de la jonction de ces fibres à la trame conjonctive dont le collagène représente la composante protéique majeure (Nishimura 2010; Dubost *et al.*, 2013). Les teneurs en lipides intramusculaires ont été également rapportées pour jouer un rôle prépondérant et par conséquent influencer les qualités sensorielles (Mandell *et al.*, 1997; Scollan *et al.*, 2001).

Les mécanismes qui régissent les relations entre la composition en types de fibres musculaires et les qualités sensorielles de la viande sont complexes et les résultats rapportés dans la littérature sont souvent en désaccord. Pour exemple, dans une étude sur les jeunes taurillons Charolais, 25 à 30% uniquement de la variabilité de la tendreté de la viande pourrait être expliquée par les caractéristiques du collagène et propriétés métaboliques (Renand *et al.*, 2001). Dans une autre étude, combinant sept races de différentes expérimentations, le muscle *Longissimus thoracis* caractérisé par de faibles teneurs en collagène et des activités contractiles et métaboliques intenses, avaient des notes de tendreté élevées. Cependant, les corrélations n'expliquaient qu'environ 4% de la variabilité entre les animaux (Chriki *et al.*, 2012). Dans d'autres études, les caractéristiques musculaires pouvaient prédire les qualités sensorielles pour un muscle, mais pas pour plusieurs muscles et présentaient de faibles pouvoirs explicatifs (Keith *et al.*, 1985; Bonny *et al.*, 2015).

La présente étude vise à comparer les relations entre quelques caractéristiques musculaires objectives à savoir le type de fibres, les teneurs en collagène (soluble et insoluble), les teneurs en lipides intramusculaires et les activités enzymatiques (ICDH, COX, CS, LDH et PFK) et les qualités sensorielles de la viande du muscle *Longissimus thoracis* de différents types d'animaux. L'objectif principal était de déterminer si des relations consistantes existaient entre les qualités sensorielles et les caractéristiques musculaires, indépendamment du sexe et de la race. Cette étude a été réalisée dans le cadre du projet européen ProSafeBeef.

Differences and similarities in associations among muscle characteristics and sensory qualities of meat from eight different types of cattle

M. Gagaoua, E.M.C. Terlouw, D. Micol, J.F. Hocquette A.P. Moloney, K. Nuerenberg, D. Bauchart, A. Boudjellal, N.D. Scollan, R.I. Richardson, B. Picard,

Soumis pour publication dans Journal of Integrative Agriculture (2015) xx, xxx - xxx

Résumé :

La présente étude vise à comparer huit races bovines qui diffèrent par leur génotype (génisses, jeunes taurillons et bœufs), afin de déterminer les relations entre les caractéristiques musculaires et les qualités sensorielles de la viande du muscle *Longissimus thoracis* (entrecôte) grillée à 55°C. Les résultats obtenus ont montré que les types d'animaux diffèrent pour l'ensemble des caractéristiques musculaires et qualités sensorielles. De nombreuses corrélations entre les caractéristiques musculaires et les qualités sensorielles sont consistantes pour la plupart des types d'animaux. L'activité de l'enzyme ICDH a permis une véritable discrimination des muscles en complémentarité des proportions des isoformes de myosines MyHC-I et ce, sur l'ensemble des types d'animaux. Les activités métaboliques de la LDH et PFK étaient corrélées positivement chez la plupart des types d'animaux. L'appréciation globale a été corrélée avec la flaveur et la flaveur anormale pour l'ensemble des types d'animaux et avec la tendreté globale, exceptés pour les jeunes taurillons de la race Charolaise croisée. De plus, pour l'ensemble des types d'animaux, excepté les croisés Aberdeen Angus x Friesian, la flaveur et la flaveur anormale ont été corrélées négativement. L'appréciation globale n'a pas été trouvée corrélée avec la jutosité pour l'ensemble des types d'animaux. Les activités métaboliques de PFK, ICDH et CS étaient fortement associées à la tendreté, la flaveur et l'appréciation globale lorsque les valeurs moyennes pour tous les types d'animaux ont été utilisées. Toutefois, les associations entre les caractéristiques musculaires et les qualités sensorielles chez tous les types d'animaux étaient faibles ou inconsistantes.

Mots clés : Bovin; caractéristiques musculaires ; qualités sensorielles de la viande; sexe; race; prédiction.

3 M. Gagaoua^{1,2,3}, E.M.C. Terlouw^{1,2}, D. Micol^{1,2}, J-F. Hocquette^{1,2}, A.P. Moloney⁴, K.
4 Nuernberg⁵, D. Bauchart^{1,2}, A. Boudjellal³, N.D. Scollan⁶, R.I. Richardson⁷, and B. Picard^{1,2,*}

7 ² VetAgro Sup, UMRH 1213, Unité de Recherches sur les Herbivores, Theix, 63122 Saint
8 Genès Champanelle, France.

³ Equipe Maquay, INATAA, Université Frères Mentouri Constantine, Route de Ain El-Bey, 25000 Constantine, Algeria.

11 ⁴ Teagasc, Animal and Grassland Research and Innovation Centre, Grange, Dunsany, Co.
12 Meath, Ireland.

⁵ FBN Leibniz Institute for Farm Animal Biology, W-Stahl-Allee 2, 18196 Dummerstorf, Germany.

⁶ Institute of Biological, Environmental and Rural Sciences, Aberystwyth University, Gogerddan, SY23 3EB, UK.

17 ⁷Division of Farm Animal Science, University of Bristol, Langford, Bristol, BS40 5DU, UK.

18 * **Correspondence:** Dr. Brigitte PICARD brigitte.picard@clermont.inra.fr

The present study compared eight breeds of cattle differing in gender (heifers, bulls and steers), to determine associations between muscle characteristics and meat sensory qualities in the *Longissimus thoracis* muscle. Animal types differed in all the muscle characteristics and sensory qualities. Many correlations among muscle characteristics and among sensory qualities were consistent for most animal types. ICDH activities allowed discrimination of muscles with respect to MyHC-I proportions for all animal types. LDH and PFK activities were positively correlated for most animal types. Overall liking was correlated with beef flavour and abnormal flavour in all animal types and with global tenderness for all animal types except for Charolais cross breed steers. For all animal types except for Angus x Friesian heifers, beef flavour and abnormal flavour were negatively correlated. Overall liking was not correlated with juiciness. PFK, ICDH and CS activities were strongly associated with tenderness, beef flavour and overall liking when average values for all animal types were used. However, associations between muscle characteristics and sensory qualities within animal types were weak and inconsistent.

Key words: Cattle; muscle characteristics; meat sensory qualities; gender; breed; prediction.

1. Introduction

Meat quality attributes (colour, tenderness, flavour and juiciness) have major effects on the satisfaction of the consumer ([Dransfield et al. 2003](#)). These attributes are influenced by muscle characteristics of the animal and *post-mortem* biochemical reactions ([Ouali 1990](#); [Dransfield et al. 2003](#); [Jurie et al. 2007](#)). Muscle characteristics are influenced by management factors such as breed, age, sex and diet ([Cuvelier et al. 2006](#); [Jurie et al. 2006](#)). They depend on the contractile and metabolic properties of the different categories of the myofibres (type I, type IIa, type IIx and/or type IIb) that compose the bovine skeletal muscles ([Picard & Cassar-Malek 2009](#)) and on the attachment of these fibres to the intramuscular connective tissues (IMCT) of which collagen is the major protein component ([Nishimura 2010](#); [Dubost et al. 2013](#)). Intramuscular fat (IMF) content is also believed to influence sensory qualities ([Mandell et al. 1997](#); [Scollan et al. 2001](#)).

The mechanisms underlying the relationships between muscle fibre type composition and sensory qualities are complex and results are inconsistent across studies. In a study on young Charolais bulls, 25 to 35% of variability in global tenderness could be explained by collagen characteristics and metabolic properties ([Renand et al. 2001](#)). In a study combining seven breeds and cross-breeds from different experiments, *Longissimus thoracis* muscles with lower collagen contents and increased contractile and metabolic properties had greater tenderness, but each correlation explained at most 4% of the variability between animals ([Chriki et al. 2012a](#)). In other studies, muscle characteristics could predict sensory qualities across, but not within muscles and with varying precision ([Keith et al. 1985](#); [Bonny et al. 2015](#)).

The present study aims to compare relationships between muscle characteristics (fibre type, collagen, intramuscular fat contents and enzyme activities) and meat sensory qualities in *Longissimus thoracis* muscle between different types of cattle. The main objective was to determine whether consistent relationships exist between sensory qualities and muscle characteristics, independently of gender and breed or rearing site. The study is a part of the European ProSafeBeef project (www.prosafebeef.eu).

2. Results

2.1. Associations among muscle characteristics and sensory qualities at the level of the animal type

Differences between animal types in terms of LT muscle characteristics and sensory qualities are described in Table 1. Correlations based on values of Table 1 indicate that certain traits are strongly associated at the level of the animal type (Table 2a-c; Fig 1). For example, animal types with high COX activity had also high ICDH activity but low LDH activity. High COX activity was further associated with high MyHC-I proportions, low MyHC-IIx+b proportions and high ultimate pH. Animal types with higher proportions of MyHC-IIa had higher levels of collagen. Certain correlations did not reach significance due to the low level of degrees of freedom ($df = 6$). Animal types with high tenderness had high beef flavour and overall liking and were characterised by low PFK and high CS activities (Table 2c). High tenderness was also associated with high IMF (Table 2c). The PCA plots illustrate visually the relationships between muscle characteristics and sensory qualities (variable loadings: Fig. 2a) and the similarities and differences between the breeds and genders of the different experiments (average individual scores: Fig. 2b). The first principal component accounting for 28% of variability was positively correlated with oxidative enzyme activities (ICDH, COX and CS), MyHC-I fibres, tenderness, juiciness, beef flavour and overall liking and negatively correlated with MyHC-IIx+b and the activity of the glycolytic enzymes PFK and LDH. The second principal component accounting for 21.7% of the variability was relatively strongly positively correlated with total and insoluble collagen and negatively with IMF content and the activity of the glycolytic enzyme LDH. Individual scores of the first axis averaged per breed discriminated between nearly all breeds, apart from AF heifers and Ho bulls, who had similar scores, and BF heifers and AA bulls, who had also similar scores (Fig 2c). Briefly, CHx and BH steers were characterised by high activities of oxidative enzymes and MyHC-I and high scores for tenderness, juiciness, beef flavour and overall liking, while for Li and BA bulls this was the opposite. BF heifers and AA bulls had the same profile as the latter group, but less extreme. AF heifers and Ho bulls had intermediate profiles. Individual scores of the second axis averaged per breed formed 3 groups that differed significantly (Fig. 2c). The AA and Ho bulls scored relatively high for collagen and PFK and low for LDH and MyHC-IIx+b while BF and AF heifers scored the opposite. The BA and Li bulls and BH and CHx steers had intermediate levels. In conclusion, the eight groups differed on at least one of the two first principal axes.

2.2. Correlations among muscle characteristics within animal types

Correlations calculated per animal type using Z-scores (Fig. 3a) found that MyHC-IIx+b proportions were negatively correlated with MyHC-I and MyHC-IIa proportions for nearly all animal types. LDH and PFK activities were weakly positively correlated for all breeds apart from BA and Ho. ICDH, COX and CS were positively correlated for at least half of the animal types. ICDH and LDH, and MyHC-I and LDH were negatively correlated for four animal types. These correlations were not gender specific, as the three genders were represented in each of the correlations. Total collagen content was strongly correlated to insoluble collagen for all animal types, as expected. In addition to the figure, for BH heifers LDH activity were negatively correlated ($r=-0.44$; $P < 0.05$) with COX activity, and for AA bulls, with CS activity ($r=-0.44$; $P < 0.05$).

2.3. Correlations among sensory qualities within animal types

With respect to sensory qualities, for all animal types, overall liking was positively correlated with beef flavour and negatively with abnormal flavour. For all animal types except for AF heifers, beef flavour and abnormal flavour were negatively correlated (Fig. 3b). Overall liking was further correlated with global tenderness for all animal types except for CHx steers. These correlations were again not gender specific, as the three genders were represented in each of the correlations found. In addition, global tenderness was positively correlated with juiciness for three of the animal types and with beef flavour, also for three animal types (Fig. 3b). None of the animal types showed a correlation between juiciness and beef flavour (r between -0.20 and 0.28 ; NS).

2.4. Correlations between sensory qualities and muscle characteristics within animal types

It was not possible to establish a coherent correlation network for correlations between sensory qualities and muscle characteristics as only one significant ($P < 0.05$) correlation was found that showed some consistency across animal types. Tenderness was correlated with CS content for Li bulls ($r = 0.43$), AF heifers ($r = 0.34$) and BH steers ($r = 0.39$). For these animal types, the overall r -value (on Z-scores) was 0.38 ($P < 0.0001$). In addition, fourteen more correlations were found between muscle characteristics and sensory qualities with r -values over 0.40 ($P < 0.05$), but showing no consistency across animal types. Most correlations were found for Li bulls: abnormal beef flavour with PFK ($r=0.47$), beef flavour with MyHC-IIa, MyHC-IIb+x and LDH ($r=0.40$; -0.47 and -0.52 , respectively), overall liking with insoluble collagen and PFK ($r=-0.63$ and -0.43 , respectively) and juiciness with pHu ($r=0.48$). For Ho

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

bulls, beef flavour was correlated with MyHC-IIa and COX ($r=-0.52$ and 0.49 , respectively) and juiciness with MyHC-IIa, ICDH and COX ($r=-0.50$; 0.51 and 0.67 , respectively). For AF heifers, juiciness was correlated with insoluble collagen and lipid content ($r=-0.40$ and 0.55 , respectively). Other significant correlations were found for AF and BF heifers and BH steers, but they were relatively weak ($r < 0.40$).

The lack of consistency between animal types explains the weak explanatory power of the regression models subsequently established. When genders were considered separately using raw data of muscle characteristics, the models explained between 4.6 and 39.5% of the variability between animals (Table 3). However, breed explained most of the variability and the contribution of muscle characteristics was weak. The strongest contribution was IMF, explaining 9% of the variability in overall liking between bulls. LDH activity in heifers, and pHu and CS activity in steers, contributed between 6 and 7% to tenderness.

The explanatory power of regression analyses between Z-scores of sensory qualities and muscle characteristics (Table 3) was also very weak. For tenderness, regression analyses using Z-scores found that CS, MyHC-IIa and IMF explained together 4.8% of the variability between animals. For overall liking, total collagen content and IMF explained together 7.2% of the variability between animals in overall liking.

3. Discussion

The present study compared *Longissimus thoracis* muscle characteristics and sensory qualities to explore consistencies and differences in correlations between muscle characteristics and sensory qualities in eight animal types. The animals were similar in age and had all been subjected to a finishing period of 100 days in average. The animal types differed in breed, gender and rearing site, where each rearing site corresponded to a given gender and breed. Untransformed data were used to compare animal types, and Z-scores, after removing the effects of animal type, were used to describe similarities across animal types.

Across all animal types, the LT muscle had high glycolytic and intermediate oxidative properties. Similarly, (Chriki *et al.* 2012b) classified the LT muscle as fast oxido-glycolytic. The animal types differed in all the measured contractile and metabolic muscle characteristics and sensory qualities. The animal types were characterised by significantly different positions along the first principal axes of the PCA indicating that the first two axes had good discriminatory power for the animal types used in the study. Due to the choice of breeds, breed

effects were stronger for steers and bulls than for heifers. Overall, the LTs of heifers and steers were more glycolytic and oxidative oriented, respectively, while the LT of bulls was intermediate, as also previously reported ([Jurie et al. 2009](#)). More specifically, compared to the steers and bulls, the heifers had lower MyHC-I proportions, higher LDH and lower COX activities. The fibre type distribution of the BH steers was close to the distribution observed in the heifers, while CHx steers had high MyHC-I proportions.

Sensory analysis revealed also many significant differences between animal types. Steers had the best and bulls the worst scores for sensory qualities, with intermediate levels for heifers. The best scores were obtained for the CHx steers. The CHx steers and Ho bulls and both heifer breeds scored high for juiciness and Ho bulls scored high for beef flavour compared to the other bulls. These observations agree with earlier results reporting better sensory scores for steers than heifers and for heifers than bulls ([Wulf et al. 1996](#); [Choat et al. 2006](#); [Bureš & Bartoň 2012](#)). Other results found, in contrast, no differences between steers and heifers or between young bulls and heifers ([Hoving-Bolink et al. 1999](#)) in terms of tenderness. Another study found, also in contrast to our results, higher scores for juiciness and beef flavour for heifers compared to steers ([Hennessy & Morris 2003](#)).

Correlations on average values of animal types found coherent associations between fibre type composition and glycolytic and oxidative enzymes. Coherent associations among muscle characteristics were also found within animal types. The correlation network shows that oxidative characteristics (MyHC-I, ICDH, COX and CS) were negatively associated with glycolytic characteristics (MyHC-IIx+b and LDH) for a majority of animal types.

For the eight animal types studied, ICDH activity was correlated with the proportion of slow oxidative fibres, MyHC-I. These results are coherent with earlier results showing that MyHC-I proportions may be appropriate to characterise the muscle in terms of oxidative capacity in pigs ([Gil et al. 2003](#)), cattle ([Olivan et al. 2004](#)), rabbits ([Ramirez et al. 2004](#)), and sheep ([Sazili et al. 2005](#)). Overall, results are coherent with existing knowledge on the associations between metabolic and contractile characteristics of muscle fibres, but apart from the correlation between ICDH activity and MyHC-I proportions, many variations existed within the animal types. The relatively weak explanatory power of muscle characteristics is in accordance with other studies ([Keith et al. 1985](#); [Chriki et al. 2012b](#); [Bonny et al. 2015](#)).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

189 The comparison between the analyses within animal type and the analysis on average values
190 of animal types indicates that although overall, similar biological laws operate in the eight
191 animal types, when looked at in detail, the precise balance between enzymes may be regulated
192 differently according to animal type. For example, PFK and CS activities were strongly
193 negatively correlated when average values of animal types were used but this correlation was
194 not found within animal types, suggesting that these enzymes are not directly causally related.
195 The negative association between LDH and ICDH observed in part of the animal types may be
196 explained by the competition relative to the fate of pyruvate, conversion into lactate or entrance
197 into the citric acid cycle. The absence of consistent correlations between two traits may be also
198 related to the fixed effects. For example, PFK and LDH activities were not correlated when
199 average values were used, because bull breeds had much higher PFK activity but similar LDH
200 activity compared to the other breeds.

201 Correlations between sensory qualities within animal types or using averages per animal
202 type associated high beef flavour, high tenderness and high overall liking. Beef flavour and
203 juiciness were correlated when average values of animal types were used, but not within any of
204 the animal types, suggesting that meat from certain animal types (i.e. heifers, steers and Ho
205 bulls) had more beef flavour and were juicier but that there was no causal link between the two
206 traits. The correlations show a strong consistency in the determinism of overall liking across
207 animal types and suggest that flavour may be as important as tenderness in determining overall
208 liking for fresh beef steaks as also early indicated ([Motttram 1998](#); [Monson et al. 2005](#)). No
209 relationship was found between overall liking and juiciness. These findings are consistent with
210 a previous study, which found tenderness and flavour to be the most important attributes in
211 beef eating quality by UK consumers while juiciness had a relatively low impact ([Glitsch](#)
212 [2000](#)). In contrast, a previous study on bulls found that overall liking was associated with
213 tenderness and flavour, but also with juiciness ([Monson et al. 2005](#)).

214 In contrast to overall liking, the determinism of tenderness in terms of other sensory
215 attributes showed little consistency when animal types were considered separately. The only
216 correlation showing some consistency was between tenderness and juiciness: for three animal
217 types, CHx steers and AF and BF heifers. Similar results were earlier reported ([Serra et al.](#)
218 [2008](#); [Oury et al. 2009](#); [Gagaoua et al. 2013](#)). These animal types had higher tenderness and
219 juiciness scores than the other animal types. Possibly, at higher levels of tenderness and
220 juiciness, the perceptions of tenderness and juiciness reinforce each other mutually. Meat

221 juiciness is considered to arise from moisture released by meat during chewing, and moisture
222 from saliva ([Juarez et al. 2012](#)).

223 The negative association between tenderness and abnormal beef flavour observed for bulls
224 may be related to the halo effect, *i.e.* the perceived level of a sensory quality is influenced by
225 another sensory quality ([Gill et al. 2010](#)). In bulls, abnormal beef flavour scores were relatively
226 high compared to heifers and steers.

227 Correlations between muscle characteristics and sensory qualities were weak within and
228 inconsistent across animal types. In contrast, high CS activities, high IMF contents and low
229 PFK activities were very good predictors for good tenderness and overall liking, but only when
230 average values of animal types were used. These correlations were however inconsistent with
231 correlations within animal types. Thus, the relationships between high tenderness and overall
232 liking, and high CS activities and IMF contents and low PFK activities were, at least in part,
233 only indirect. The associations found in the regression models were, albeit weak, coherent with
234 earlier studies. For example, tenderness was slightly better in meat from young bulls containing
235 more MyHC-IIa, from steers with higher CS activity and from heifers with lower LDH
236 activity. This is coherent with earlier studies showing positive correlations between LT
237 tenderness and proportions of slow oxidative fibres ([Renand et al. 2001](#); [Chriki et al. 2012a](#)).
238 ([Zamora et al. 1996](#)) found a positive relationship between myofibre resistance and CS
239 activity. However, other studies found negative ([Ozawa et al. 2000](#)), or little or no correlations
240 ([Vestergaard et al. 2000](#)).

241 IMF content was retained in several explanatory models of tenderness and overall liking; the
242 only meaningful contribution of IMF content was to overall liking in the young bulls, where it
243 reached 9%. For comparison, ([Wheeler et al. 1994](#)) who evaluated 1667 cattle and ([Bonny et](#)
244 [al. 2015](#)) who evaluated 6 muscles from 36 cattle found that IMF explained at most 5 to 6% of
245 the variation in palatability traits. Recently, another study conducted by our group found no
246 effect of IMF on the tenderness score in LT muscle of young bulls and cows ([Chriki et al.](#)
247 [2013](#)).

248 Total collagen content had a weak negative effect on overall liking both in heifers and
249 steers. Although negative associations between total collagen content and overall liking and
250 tenderness were earlier reported, these associations existed only across but not within muscles,

suggesting that in contrast to our study, in these studies, there was no direct causal relationship, but rather an effect of muscle ([Schonfeldt & Strydom 2011](#); [Bonny et al. 2015](#)).

Finally, pHu was weakly correlated with tenderness in steers. Earlier reports indicated that ultimate pH may influence meat including flavour, juiciness and tenderness ([Motttram 1998](#); [Calkins & Hodgen 2007](#); [Boudjellal et al. 2008](#)). The absence of relationships for heifers and bulls may be related to the narrow range of ultimate pH in these animal groups (5.50 to 5.62).

4. Conclusion

Overall, on the level of animal type, markers of oxidative metabolism and slow contractile fibres, and increased IMF content were strongly associated with higher tenderness and overall liking of the LT muscle. Nevertheless, the biological indicators varied and the associations were much weaker. For example, in heifers, higher tenderness was associated with lower LDH activity and in steers with higher CS activity. These differences and the weak correlations illustrate the multifactorial nature of the determinism of tenderness and overall liking ([Renand et al. 2001](#); [Purslow 2005](#)). In addition, associated characteristics may have opposite effects. For example, animal types with higher proportions of oxidative fibres (I and IIa) had higher tenderness but higher proportions of MyHC-IIa were associated with higher total collagen content, which reduced tenderness. Thus, a given characteristic such as high proportions of a given fibre type may produce contrasting effects on sensory qualities. Multiple and partly opposite effects add to the complexity of the determinism of sensory qualities and may explain the relatively strong effects of animal type in the present study.

In conclusion, when considering average values per animal type, the present results show strong associations between increased tenderness and overall liking, and oxidative and slow contracting muscle fibre characteristics of the LT muscle. However, to understand and predict meat quality at the level of the individual animal based on muscle characteristics, the animal characteristics need to be taken into account, including breed, gender and undoubtedly also, age.

5. Materials and methods

5.1. Animals

The study used 265 beef cattle of comparable chronological age (less than two years old) and different genders of four different experiments of the European ProSafeBeef project. The

eight animal types included young bulls (B), *i.e.* 25 Limousin (Li), 25 Blond d'Aquitaine (BA) and 24 Angus (AA) reared in France (FR) and 25 Holstein (Ho) reared in Germany (DE); steers (S), *i.e.* 40 Belgian-Blue x Holstein (BH) and 32 Charolais crossbred (CHx) reared in Wales (UK); and heifers (H), *i.e.* 47 Belgian-Blue x Friesian (BF) and 47 Angus x Friesian (AF) reared in Ireland (IE). Hence each experiment corresponded to a different gender of cattle, and young bulls were reared in two experiments. The aim of the study was not to compare genders or breeds, but to evaluate differences and similarities between different animal types.

5.2. Management, slaughtering and sampling

During the finishing period (90 to 110 days), the animals were housed in groups of 4 animals of a same breed in 4 x 4 m pens with *ad libitum* access to high energy feed in the four experimental farms. The diets of the animals consisted of pasture, grass silage or concentrates, supplemented with lipids and/or antioxidant from plants additives according to ProSafeBeef project. Results presented in the present study were not influenced by feed composition.

The 265 beef animals were slaughtered when they achieved the fat class 3 on the EUROP grid of carcass classification (European Economic Community Regulations (EEC) No. 1208/81). Each research group slaughtered approximately equal numbers of cattle from each nutritional diet/animal type combination on each slaughtering day. They were all slaughtered under standard conditions in either commercial or experimental slaughterhouses, depending on the facilities of each country. Before slaughter, all animals were food deprived for 24 hours and had free access to water. Slaughtering was performed in compliance of the welfare regulations of each country. The carcasses were not electrically stimulated and they were chilled and stored at 4°C until 24 h *post-mortem*. Ultimate pH was recorded between the 6th and 7th rib using a pH meter equipped with a glass electrode, 24h or 48 h (Ireland) *post-mortem*.

The *Longissimus thoracis* muscle (LT, fast oxido-glycolytic) was excised from the right side of the carcass 24 h after slaughter. The epimysium was carefully dissected and about 400g of muscle was taken between the sixth and eleventh ribs of the LT muscle. Muscle cuts were divided into 3 parts, one for sensory evaluation and two for biochemical analysis. Part of the sample was frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until analysed for determination of enzyme activities, protein extraction and myosin heavy chain (MyHC) quantification. Another part of the sample was cut in pieces (1-2 cm cross-section), vacuum packed and stored at -

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

20°C until analysed for collagen and intramuscular fat content. Samples for sensory evaluation were cut into steaks and placed in sealed plastic bags under vacuum and kept between 2 – 4°C for 14 days (bulls from France and Germany and heifers from Ireland) or 10 days (steers from UK) for ageing. Each loin sample was then frozen and stored at –20°C until sensory evaluation. All evaluations of muscle characteristics, intramuscular fat content excepted (using the same protocol), were conducted by the same laboratory (INRA, France).

5.3. Enzyme activities measurement

Glycolytic enzyme activities [phosphofructokinase (PFK; EC 2.7.1.11); lactate dehydrogenase (LDH; EC 1.1.1.27)] and oxidative enzyme activities [isocitrate dehydrogenase (ICDH; EC 1.1.1.42), citrate synthase (CS; EC 4.1.3.7) and cytochrome *c* oxidase (COX; EC 1.9.3.1)] were quantified as described by (Jurie *et al.* 2006). Two hundred mg of frozen muscle was thawed, ground and homogenized with a Polytron during 15 s in a 5% (w/v) solution buffer of 10 mM Trizma-Base (pH 8.0), 250 mM sucrose and 2 mM EDTA. One aliquot of homogenate was centrifuged at 6000g for 15min at 4°C for determination of PFK, LDH and ICDH activities. The rest of the homogenate was freeze thawed and sonicated for determination of CS and COX activities before centrifugation for the determination of CS activity. Enzyme activities (means of triplicate) were measured at 25°C or 28 °C using an automatic spectrophotometric analyser. The results were expressed as units per gram of wet muscle.

5.4. Intramuscular connective tissue measurement

Lyophilized muscle powder was prepared for collagen determination as described by (Jurie *et al.* 2007). Briefly, frozen muscle was homogenized in a household cutter, freeze-dried for 48h, pulverized in a horizontal blade mill and stored at 4°C until analysed. To estimate total and insoluble collagen, the amount of total hydroxyproline (OH-prol) content was measured.

Total collagen content was determined after overnight hydrolysis of 50 mg of lyophilized muscle powder with 10 ml HCl 6 N at 105°C according to the method of. (Listrat *et al.* 1999). Insoluble collagen was determined in triplicate according to a procedure adapted from (Hill 1966). Lyophilised muscle powder (100 mg) was rehydrated for 1 h in 10 ml of buffer (0.23 M NaCl, 25 mM Trizma, pH 7.4) before being heated in a water bath at 75°C for 1 h. After centrifugation at 4000 g for 15 min at 20°C, the pellets were evaporated for 4 h to dryness at 45°C. After this, they were hydrolysed with 10 ml of HCl 6 N and treated as for total collagen.

The data (means of triplicates) are expressed in μg of OH-prol per mg of dried matter for both total and insoluble collagen.

5.5. Intramuscular fat content (IMF) measurement

Steaks (20 mm thick) of LT muscle were taken as described by (Scollan *et al.* 2001) for the analysis of fatty acids (FA) composition. Briefly, total intramuscular fat content from a tissue powder were extracted with chloroform-methanol (2:1, v/v) according to the method of Folch (Folch *et al.* 1957) by homogenisation at room temperature. The lipid contents were determined by gas liquid chromatography (GLC) on CP Sil 88 glass capillary column. Muscle total lipids are reported as g of fatty acid per 100 g wet tissue.

5.6. Protein content quantification

The protein concentrations of the samples were determined according to the Bradford method (Bradford 1976) using the Bio-Rad Protein Assay. Bovine serum albumin (BSA) at a concentration of 1 mg/mL was used as standard.

5.7. Electrophoresis and quantification of MyHC

Myofibrillar proteins from the LT muscles were extracted on ice as described by (Picard *et al.* 1994). Briefly, 100 mg of frozen muscle were ground in 5ml of extraction buffer solution containing 0.5 M NaCl, 20 mM Na Pyrophosphate, 50 mM Tris, 1 mM EDTA and 1 mM Dithiothreitol. After 10 mn at 4°C on ice, the sample was centrifuged for 5 min at 5000g. Following centrifugation, the supernatant was diluted 1:1 (v/w) with glycerol at 87% and stored at -20°C until used. The samples were then mixed with an equal volume of loading buffer containing 4% SDS (w/v), 125 mM Tris, pH 6.8, 20% glycerol (v/v), 10% β -mercatpethanol (v/v) and 0.02% pyronin Y (w/v). The proteins were separated by SDS-PAGE electrophoresis according to (Picard *et al.* 2011) using 9.2% polyacrylamide gels which were made in the Bio-Rad mini-Protean II Dual slab cell system. After staining, the gels were scanned and the proportions of the different myosin heavy chain (MyHC) bands were quantified by densitometry with ImageQuant Software 5500 (Amersham Biosciences/GE Healthcare).

The quantification of the bands revealed the existence of MyHC-IIb isoform (Picard & Cassar-Malek 2009) in only 22 of the 265 animals (BH (8); BA (6); CH (5); AA (2); and Li

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

(1)) with a maximal percentage of 5.5 %. Consequently MyHC-IIb percentages were totalled with those of MyHC-IIx creating a new variable “MyHC-IIx+b” (fast glycolytic fibres).

5.8. Sensory analysis

Sensory analysis was performed at Bristol university in the United Kingdom on the LT muscle taken 24 h after slaughter as previously described ([Karamichou et al. 2007](#); [Gagaoua et al. 2013](#)). Each loin sample was aged 14 days (bulls from France and Germany and heifers from Ireland) or 10 days (steers from United Kingdom). Approximately forty hours before sensory assessment, samples were thawed, without stacking or overlapping, at 4–5°C. The morning of the analysis, the meat samples were cut into two 1.9 cm thick steaks and cooked under domestic grills, turning every two minutes until the temperature of 74°C (typical in the UK) was reached as measured in the geometric centre of the steak (measured by a thermocouple probe). After grilling, each steak was cut into 3 x 2 x 2 cm portions which were immediately presented to 10 panellists trained in beef meat sensory analysis. Each tasting booth was equipped with computer terminals linked to a fileserver also running a sensory software programme (FIZZ v 2.20h, Biosystemes, Couternon, France) that facilitated the direct entry of assessor ratings on a 0 to 10 unstructured scale to evaluate the following attributes: global tenderness (0 – extremely tough, 10 – extremely tender), juiciness (0 – extremely dry, 10 – extremely juicy), beef flavour intensity (0 – extremely weak, 10 – extremely strong), abnormal flavour intensity (0 – extremely weak, 10 – extremely strong) and overall liking (0 – dislike very much, 10 – like very much). All sensory assessments were completed under red light in a purpose built sensory analysis room.

5.9. Statistical analysis

The SAS software (Version 9.1, 2002; SAS Institute Inc.) was used to verify the normality of the data and to conduct ANOVA and principal component analyses (PCA). Pearson correlations, ANCOVA and regression analyses were carried out using XlStat (Version 2009.1.01, Addinsoft ®). Data were normally distributed (Shapiro-Wilk test). ANOVA was used to compare animal types. For these comparisons, the General Linear Model (GLM) procedure fitting animal type as fixed effect, and Tukey test were used to compare LSmeans (SAS Version 9.1, 2002; SAS Institute Inc.). PCA (Pearson) was conducted on all variables using all animal types to produce graphs to illustrate visually the different characteristics of the animal types. An overall Kaiser’s Measure of Sampling Adequacy (MSA) was calculated using

PROC FACTOR of SAS. Variables with low MSA (< 0.5) were removed from the final PCA. ANOVA was carried out to compare the individual PCA scores on the first and second axis between breeds.

Pearson correlations were calculated across animal types using average values to determine which muscle characteristics and sensory qualities were associated at the level of animal types. Pearson correlations were further calculated within animal types, to determine consistency of relationships among muscle characteristics and sensory qualities across animal types. Results are reported in figures referred to as “correlation networks”. ANCOVA was used to determine relationships among sensory qualities and muscle characteristics within genders while taking into account breed.

The ANCOVA model used was $y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta(x_{ij} - \bar{x}) + \varepsilon_{ij}$

where

y_{ij} is the value of the dependent variable for j th observation in the i th animal type.

μ is the overall (constant) mean value of the dependent variable.

α_i is the effect of i th animal breed on the dependent variable.

β is the pooled regression slope of the dependent variable with the explicative variable for each breed.

x_{ij} is the value of the explicative variable for the j th observation from the i th breed.

$\bar{x}$ is the common mean of x of all samples,

ε_{ij} is the random or unexplained error associated with the j th observation in the i th animal type group not explained by the animal type of the explicative variable.

If non-significant, breed was removed from the model, *i.e.* $\alpha_i = 0$, and the model became a simple linear regression ($y_{ij} = \mu + \beta(x_{ij} - \bar{x}) + \varepsilon_{ij}$).

For ANCOVA and regression analyses, the option “optimal model” was selected. This option produces the model with the highest adjusted r^2 value. The adjusted r^2 value expressed as a percentage will be referred to as the % of variability explained. The maximal number of explanatory variables was fixed at 3. Variables that were significant but contributed less than 2% in terms of explanatory power (r^2) were excluded from the model. The standardised coefficients are reported in the Results section and refer to how many standard deviations the explained variable will change, per standard deviation change in the explanatory variable.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

433 Finally, for all variables Z-scores were calculated, removing animal type effects. This data
434 set was used to determine associations among variables after removal of breed effects. More
435 specifically, breeds showing a significant correlation between two given variables were
436 combined and an overall r-value was calculated using Z-scores and reported in the “correlation
437 networks.

438 **Acknowledgements**

439 This study was conducted within the framework of the EU Project ProSafeBeef (project no.
440 FOOD-CT-2006-36241) with INRA Quality Assurance number AQ284. The authors thank the
441 colleagues of the Aberystwyth University (UK), FBN, Teagasc (Ireland) and INRA (France)
442 for their assistance in data collection, the management and slaughter of animals, muscle
443 sampling, biochemical and sensory analyses. They further thank Constantine 1 University and
444 the INATAA Institute (Algeria) and the PROFAS B+ program for the financial support given
445 to Mohammed Gagaoua.

446 **Conflict of interest**

447 The authors state that there is no conflict of interest.

References

- Bonny S.P., Gardner G.E., Pethick D.W., Legrand I., Polkinghorne R.J. & Hocquette J.F. (2015) Biochemical measurements of beef are a good predictor of untrained consumer sensory scores across muscles. *Animal* **9**, 179-90.
- Boudjellal A., Becila S., Coulis G., Herrera-Mendez C.H., Aubry L., Lepetit J., Harhoura K., Sentandreu M.A., Ait-Amar H. & Ouali A. (2008) Is the pH drop profile curvilinear and either monophasic or polyphasic? Consequences on the ultimate bovine meat texture. *African Journal of Agricultural Research* **3**, 195-204.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Bureš D. & Bartoň L. (2012) Growth performance, carcass traits and meat quality of bulls and heifers slaughtered at different ages. *Czech Journal of Animal Science* **57**, 34-43.
- Calkins C.R. & Hodgen J.M. (2007) A fresh look at meat flavor. *Meat Sci* **77**, 63-80.
- Choat W.T., Paterson J.A., Rainey B.M., King M.C., Smith G.C., Belk K.E. & Lipsey R.J. (2006) The effects of cattle sex on carcass characteristics and longissimus muscle palatability. *J Anim Sci* **84**, 1820-6.
- Chriki S., Gardner G.E., Jurie C., Picard B., Micol D., Brun J.P., Journaux L. & Hocquette J.F. (2012a) Cluster analysis application identifies muscle characteristics of importance for beef tenderness. *BMC Biochem* **13**, 29.
- Chriki S., Picard B., Jurie C., Reichstadt M., Micol D., Brun J.P., Journaux L. & Hocquette J.F. (2012b) Meta-analysis of the comparison of the metabolic and contractile characteristics of two bovine muscles: longissimus thoracis and semitendinosus. *Meat Sci* **91**, 423-9.
- Chriki S., Renand G., Picard B., Micol D., Journaux L. & Hocquette J.F. (2013) Meta-analysis of the relationships between beef tenderness and muscle characteristics. *Livestock Science* **155**, 424-34.
- Cuvelier C., Clinquart A., Hocquette J.F., Cabaraux J.F., Dufrasne I., Istasse L. & Hornick J.L. (2006) Comparison of composition and quality traits of meat from young finishing bulls from Belgian Blue, Limousin and Aberdeen Angus breeds. *Meat Sci* **74**, 522-31.
- Dransfield E., Martin J.-F., Bauchart D., Abouelkaram S., Lepetit J., Culioli J., Jurie C. & Picard B. (2003) Meat quality and composition of three muscles from French cull cows and young bulls. *Animal Science* **76**, 387-99.
- Dubost A., Micol D., Picard B., Lethias C., Andueza D., Bauchart D. & Listrat A. (2013) Structural and biochemical characteristics of bovine intramuscular connective tissue and beef quality. *Meat Sci* **95**, 555-61.
- Folch J., Lees M. & Sloane Stanley G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* **226**, 497-509.
- Gagaoua M., Micol D., Richardson R.I., Hocquette J.F., Terlouw E.M.C., Meteau K., Juin H., Moloney A.P., Nuernberg K., Scollan N.D., Boudjellal A. & Picard B. (2013) Relationships between overall liking score and sensory meat attributes in different types of beef cattle. In: *Proceedings of the 59th International Congress of Meat Science and Technology*, p. 4, Izmir, Turkey.
- Gil M., Oliver M.A., Gispert M., Diestre A., Sosnicki A.A., Lacoste A. & Carrión D. (2003) The relationship between pig genetics, myosin heavy chain I, biochemical traits and quality of M. longissimus thoracis. *Meat Science* **65**, 1063-70.
- Gill J.L., Matika O., Williams J.L., Worton H., Wiener P. & Bishop S.C. (2010) Consistency statistics and genetic parameters for taste panel assessed meat quality traits and their

relationship with carcass quality traits in a commercial population of Angus-sired beef cattle. *Animal* **4**, 1-8.

Glitsch K. (2000) Consumer perceptions of fresh meat quality: cross-national comparison. *British Food Journal* **102**, 177-94.

Hennessy D.W. & Morris S.G. (2003) Effect of a preweaning growth restriction on the subsequent growth and meat quality of yearling steers and heifers. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **43**, 335.

Hill F. (1966) The Solubility of Intramuscular Collagen in Meat Animals of Various Ages. *Journal of Food Science* **31**, 161-6.

Hoving-Bolink A.H., Hanekamp W.J.A. & Walstra P. (1999) Effects of sire breed and husbandry system on carcass, meat and eating quality of Piemontese and Limousin crossbred bulls and heifers. *Livestock Production Science* **57**, 273-8.

Juarez M., Dugan M.E., Aldai N., Basarab J.A., Baron V.S., McAllister T.A. & Aalhus J.L. (2012) Beef quality attributes as affected by increasing the intramuscular levels of vitamin E and omega-3 fatty acids. *Meat Sci* **90**, 764-9.

Jurie C., Ortigues-Marty I., Picard B., Micol D. & Hocquette J.F. (2006) The separate effects of the nature of diet and grazing mobility on metabolic potential of muscles from Charolais steers. *Livestock Science* **104**, 182-92.

Jurie C., Picard B., Heyman Y., Cassar-Malek I., Chavatte-Palmer P., Richard C. & Hocquette J.F. (2009) Comparison of cloned and non-cloned Holstein heifers in muscle contractile and metabolic characteristics. *Animal* **3**, 244-50.

Jurie C., Picard B., Hocquette J.F., Dransfield E., Micol D. & Listrat A. (2007) Muscle and meat quality characteristics of Holstein and Salers cull cows. *Meat Sci* **77**, 459-66.

Karamichou E., Richardson R.I., Nute G.R., Wood J.D. & Bishop S.C. (2007) Genetic analyses of sensory characteristics and relationships with fatty acid composition in the meat from Scottish Blackface lambs. *Animal* **1**, 1524-31.

Keith F.K.M., Vol D.L.D., Miles R.S., Bechtel P.J. & Carr T.R. (1985) Chemical and Sensory Properties of Thirteen Major Beef Muscles. *Journal of Food Science* **50**, 869-72.

Listrat A., Rakadjiski N., Jurie C., Picard B., Touraille C. & Geay Y. (1999) Effect of the type of diet on muscle characteristics and meat palatability of growing Salers bulls. *Meat Sci* **53**, 115-24.

Mandell I.B., Gullett E.A., Wilton J.W., Kemp R.A. & Allen O.B. (1997) Effects of gender and breed on carcass traits, chemical composition, and palatability attributes in Hereford and Simmental bulls and steers. *Livestock Production Science* **49**, 235-48.

Monson F., Sanudo C. & Sierra I. (2005) Influence of breed and ageing time on the sensory meat quality and consumer acceptability in intensively reared beef. *Meat Sci* **71**, 471-9.

Mottram D.S. (1998) Flavour formation in meat and meat products: a review. *Food Chemistry* **62**, 415-24.

Nishimura T. (2010) The role of intramuscular connective tissue in meat texture. *Anim Sci J* **81**, 21-7.

Olivan M., Martinez A., Osoro K., Sanudo C., Panea B., Olleta J.L., Campo M.M., Oliver M.A., Serra X., Gil M. & Piedrafita J. (2004) Effect of muscular hypertrophy on physico-chemical, biochemical and texture traits of meat from yearling bulls. *Meat Sci* **68**, 567-75.

Ouali A. (1990) Meat Tenderization: Possible Causes and Mechanisms. A Review. *Journal of Muscle Foods* **1**, 129-65.

Oury M.P., Picard B., Briand M., Blanquet J.P. & Dumont R. (2009) Interrelationships between meat quality traits, texture measurements and physicochemical characteristics of M. rectus abdominis from Charolais heifers. *Meat Sci* **83**, 293-301.

- Ozawa S., Mitsuhashi T., Mitsumoto M., Matsumoto S., Itoh N., Itagaki K., Kohno Y. & Dohgo T. (2000) The characteristics of muscle fiber types of longissimus thoracis muscle and their influences on the quantity and quality of meat from Japanese Black steers. *Meat Sci* **54**, 65-70.
- Picard B., Barboiron C., Chadeyron D. & Jurie C. (2011) Protocol for high-resolution electrophoresis separation of myosin heavy chain isoforms in bovine skeletal muscle. *Electrophoresis* **32**, 1804-6.
- Picard B. & Cassar-Malek I. (2009) Evidence for expression of IIb myosin heavy chain isoform in some skeletal muscles of Blonde d'Aquitaine bulls. *Meat Sci* **82**, 30-6.
- Picard B., Leger J. & Robelin J. (1994) Quantitative determination of type I myosin heavy chain in bovine muscle with anti myosin monoclonal antibodies. *Meat Sci* **36**, 333-43.
- Purslow P.P. (2005) Intramuscular connective tissue and its role in meat quality. *Meat Sci* **70**, 435-47.
- Ramirez J.A., Oliver M.A., Pla M., Guerrero L., Arino B., Blasco A., Pascual M. & Gil M. (2004) Effect of selection for growth rate on biochemical, quality and texture characteristics of meat from rabbits. *Meat Sci* **67**, 617-24.
- Renand G., Picard B., Touraille C., Berge P. & Lepetit J. (2001) Relationships between muscle characteristics and meat quality traits of young Charolais bulls. *Meat Science* **59**, 49-60.
- Sazili A.Q., Parr T., Sensky P.L., Jones S.W., Bardsley R.G. & Buttery P.J. (2005) The relationship between slow and fast myosin heavy chain content, calpastatin and meat tenderness in different ovine skeletal muscles. *Meat Sci* **69**, 17-25.
- Schonfeldt H.C. & Strydom P.E. (2011) Effect of age and cut on tenderness of South African beef. *Meat Sci* **87**, 206-18.
- Scollan N.D., Choi N.J., Kurt E., Fisher A.V., Enser M. & Wood J.D. (2001) Manipulating the fatty acid composition of muscle and adipose tissue in beef cattle. *Br J Nutr* **85**, 115-24.
- Serra X., Guerrero L., Guardia M.D., Gil M., Sanudo C., Panea B., Campo M.M., Olleta J.L., Garcia-Cachan M.D., Piedrafita J. & Oliver M.A. (2008) Eating quality of young bulls from three Spanish beef breed-production systems and its relationships with chemical and instrumental meat quality. *Meat Sci* **79**, 98-104.
- Vestergaard M., Oksbjerg N. & Henckel P. (2000) Influence of feeding intensity, grazing and finishing feeding on muscle fibre characteristics and meat colour of semitendinosus, longissimus dorsi and supraspinatus muscles of young bulls. *Meat Sci* **54**, 177-85.
- Wheeler T.L., Cundiff L.V. & Koch R.M. (1994) Effect of marbling degree on beef palatability in Bos taurus and Bos indicus cattle. *J Anim Sci* **72**, 3145-51.
- Wulf D.M., Tatum J.D., Green R.D., Morgan J.B., Golden B.L. & Smith G.C. (1996) Genetic influences on beef longissimus palatability in charolais- and limousin-sired steers and heifers. *J Anim Sci* **74**, 2394-405.
- Zamora F., Debiton E., Lepetit J., Lebert A., Dransfield E. & Ouali A. (1996) Predicting variability of ageing and toughness in beef M. Longissimus lumborum et thoracis. *Meat Sci* **43**, 321-33.

Figure captions

Fig. 1. Correlation graphs to illustrate associations between average values per animal type of COX activities and ultimate pH (a) and PFK activities and tenderness (b)

Fig. 2. Principal component (PC) analysis using all studied variables related to beef quality and muscle characteristics.

a) Loadings on the first two principal axes: (■) collagen characteristics, (●) sensory quality attributes, (▲) metabolic characteristics as indicated by glycolytic and oxidative enzymes, (◆) MyHC isoformes, (x) Intramuscular fat content, and (Ж) pHu; b) individual scores averaged per animal type (breed x gender/site) for the first two axes. The width and height of each oval represent the standard error of the mean for the first and second axis, respectively. c) Mean scores per animal type on the 1st (top) and 2nd (bottom) axis of the PCA. An overall MSA (Kaiser’s Measure of Sampling Adequacy) of 0.75 was obtained after removal of the variable MyHC-IIa which had the lowest MSA value (MSA = 0.32). *Abbreviations:* ColTot: Total collagen; Collns: Insoluble collagen; PFK: Phosphofructokinase; LDH: Lactate dehydrogenase; ICDH: Isocitrate dehydrogenase; COX: Cytochrome c oxidase; CS: Citrate synthase; MyHC: Myosin Heavy Chain-I, and -IIx+b; IMF: Intramuscular fat content; T: tenderness; JUIC: Juiciness; BF: Beef flavour; ABF: Abnormal beef flavour; OL: Overall liking for m. *Longissimus thoracis* samples. Animal-type for breed-gender/site designation: Heifers (AF: Aberdeen Angus x Friesian, BF: Belgian-Blue x Friesian), Bulls (Ho: Holstein, Li: Limousin, BA: Blond d’Aquitaine, AA: Aberdeen Angus) and Steers (BH: Belgian-Blue x Holstein, CHx: Charolais cross-bred).

Fig. 3. Correlation network representing consistent correlations between a) muscle characteristics and b) sensory qualities.

Positive correlations are represented by a continuous line; negative correlations are represented by a dotted line. The animal types for which the correlation was significant are indicated next to the arrow. If “all” is indicated, the correlation was significant for all animals. The values next to the arrows represent the regression coefficients calculated using Z-scores including only the animal types for which the correlation was significant. *Abbreviations:* LDH: lactate dehydrogenase; PFK: phosphofructokinase; ICDH: isocitrate dehydrogenase; COX: cytochrome c oxidase; CS: citrate synthase; MyHC: Myosin Heavy Chain-I, -IIa and IIx+b.

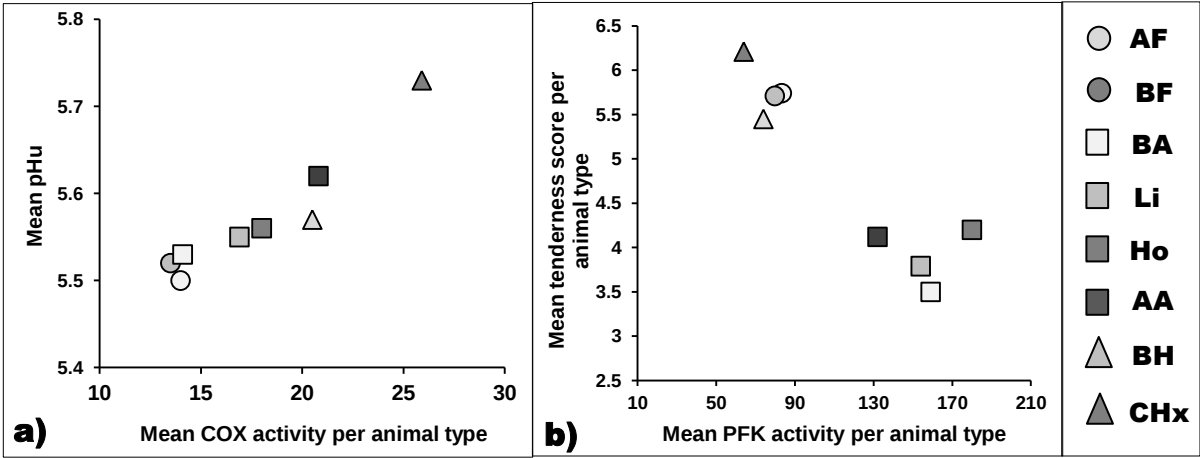


Fig. 1.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

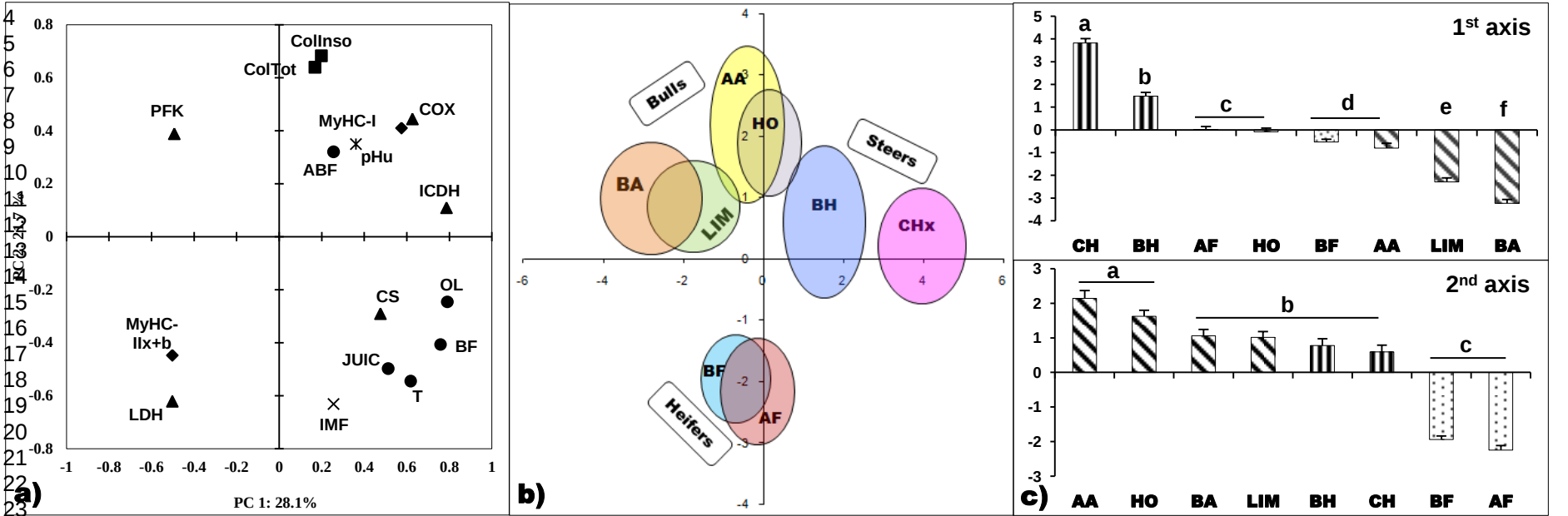


Fig. 2.

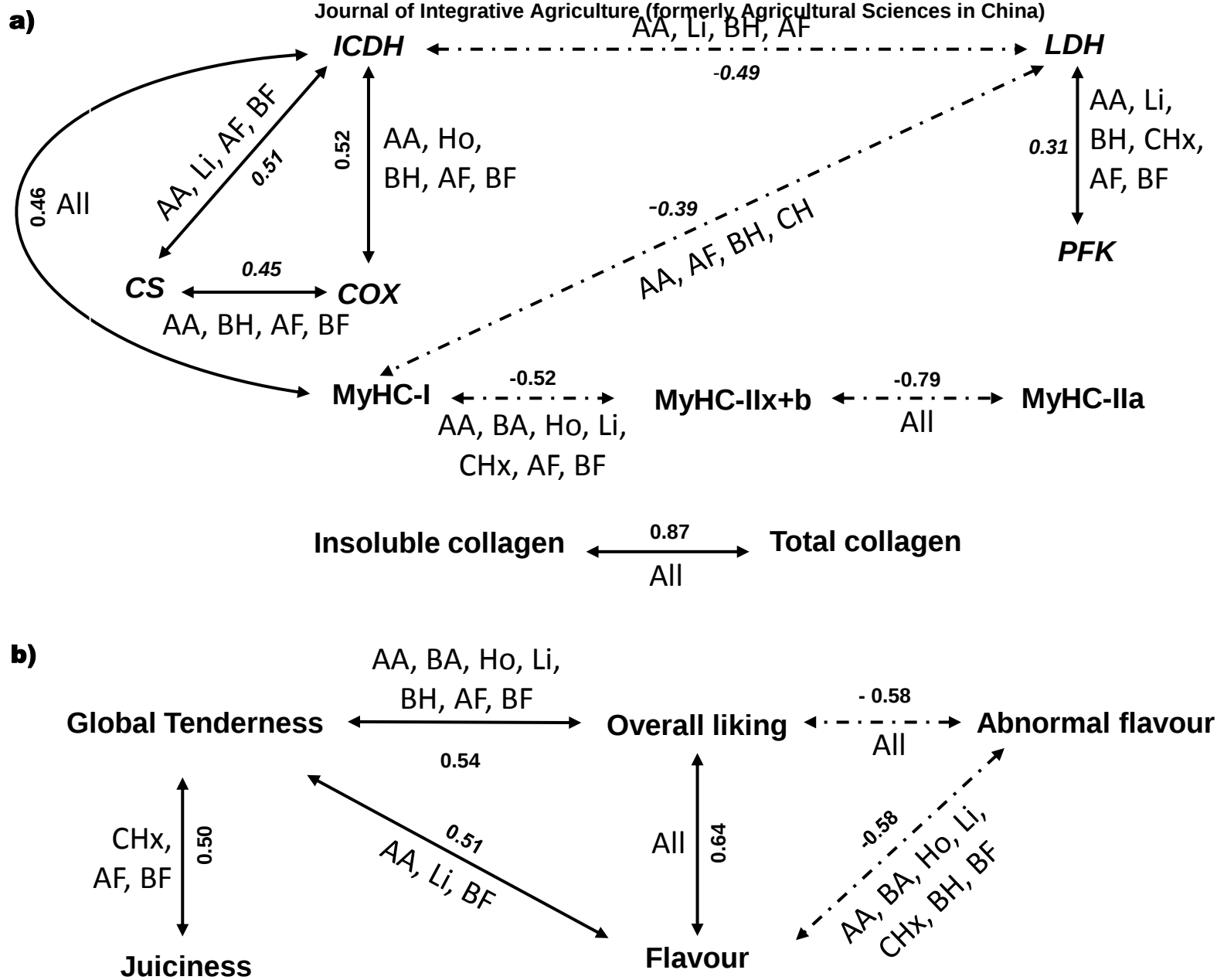


Fig. 3.

Table 1
Effect of animal type¹ on muscle characteristics and sensory qualities of *Longissimus thoracis* muscle.

Traits ²	Breed	AF	BF	Ho	Li	BA	AA	BH	CHx	SEM ³	P-value ⁴	CV (%)
	Gender	Heifers		Bulls				Steers				
	(n)	47	47	25	25	25	24	40	32			
Metabolic enzyme activities ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)												
LDH		1131 ^a	1181 ^a	921 ^c	1007 ^b	989 ^b	807 ^d	877 ^c	740 ^e	12.03	***	34.2
PFK		83.3 ^d	79.8 ^d	180 ^a	154 ^b	159 ^b	132 ^c	74 ^d	64 ^d	3.38	***	25.4
ICDH		1.28 ^c	1.24 ^c	1.62 ^b	0.96 ^{e,d}	0.77 ^e	1.11 ^{c,d}	2.08 ^a	2.14 ^a	0.04	***	47.7
COX		14.0 ^d	13.5 ^d	18.0 ^c	16.9 ^c	14.1 ^d	20.8 ^b	20.5 ^b	25.9 ^a	0.37	***	51.8
CS		6.54 ^a	6.84 ^a	4.54 ^b	5.33 ^b	5.11 ^b	5.20 ^b	7.21 ^a	7.27 ^a	0.09	***	20.0
Collagen contents ($\mu\text{g OH-prol} / \text{mg DM}$)												
Total collagen		2.84 ^c	2.95 ^c	3.74 ^b	3.33 ^{b,c}	3.26 ^{b,c}	4.40 ^a	4.57 ^a	3.35 ^{b,c}	0.07	***	32.1
Insoluble collagen		2.09 ^c	2.19 ^{b,c}	3.03 ^a	2.49 ^{b,c}	2.44 ^{b,c}	3.35 ^a	3.39 ^a	2.64 ^b	0.05	***	31.0
Myosin Heavy Chain - MyHC (%)												
MyHC-I		18.7 ^d	15.8 ^d	28.5 ^b	23.6 ^c	19.1 ^d	27.3 ^b	19.6 ^d	39.6 ^a	0.62	***	43.9
MyHC-IIa		34.9 ^{b,c}	29.9 ^c	50.2 ^a	30.7 ^c	23.9 ^d	54.4 ^a	37.7 ^b	38.8 ^b	0.81	***	36.0
MyHC-IIx+b		46.3 ^b	54.2 ^a	21.2 ^c	45.6 ^b	57.0 ^a	18.3 ^c	42.7 ^b	21.5 ^c	1.07	***	43.6
Muscle characteristics												
Ultimate pH		5.50 ^c	5.52 ^c	5.56 ^c	5.55 ^c	5.53 ^c	5.62 ^b	5.57 ^{b,c}	5.73 ^a	0.007	***	2.29
Intramuscular fat content (g/100 g wet tissue)		5.92 ^a	3.90 ^b	2.41 ^c	1.52 ^d	1.18 ^d	3.49 ^b	2.40 ^c	3.68 ^b	0.11	***	57.0
Sensory qualities (0 – 10 scale)												
Tenderness		5.74 ^{a,b}	5.71 ^{a,b}	4.20 ^c	3.79 ^{c,d}	3.50 ^d	4.12 ^c	5.45 ^b	6.21 ^a	0.08	***	25.9
Juiciness		6.60 ^a	6.54 ^a	6.76 ^a	4.78 ^c	4.30 ^d	4.65 ^c	5.53 ^b	6.75 ^a	0.06	***	18.1
Beef flavour		5.60 ^{b,c}	5.30 ^c	5.26 ^c	2.95 ^e	2.92 ^e	3.78 ^d	5.87 ^b	6.46 ^a	0.08	***	26.2
Abnormal beef flavour		2.53 ^{c,d}	2.82 ^c	3.99 ^a	2.57 ^{c,d}	2.66 ^{c,d}	2.36 ^d	3.46 ^b	3.26 ^b	0.04	***	25.7
Overall liking		4.84 ^c	4.20 ^d	3.51 ^e	3.43 ^e	3.14 ^e	3.94 ^d	5.81 ^b	7.03 ^a	0.09	***	31.5

¹ Heifers (AF: Aberdeen Angus x Friesian, BF: Belgian-Blue x Friesian), Bulls (Ho: Holstein, Li: Limousin, BA: Blond d'Aquitaine, AA: Aberdeen Angus) and Steers (BH: Belgian-Blue x Holstein, CHx: Charolais cross-bred).

² Least square means in the same row for animal type effect not followed by a common letter (a-e) differ significantly: $P < 0.05$.

³ standard error of mean

⁴ ***: $P < 0.0001$.

Table 2

Correlations between averages of animal types.

a) Muscle characteristics

Variables	LDH	PFK	ICDH	COX	CS	Total collagen	Insoluble collagen	MyHC-I	MyHC-IIa	MyHC-IIx/b
ICDH	-0.52	-0.57								
COX	-0.92	-0.28	0.72							
CS	0.02	-0.98	0.62	0.28						
Total collagen	-0.67	0.09	0.36	0.54	-0.10					
Insoluble collagen	-0.73	0.16	0.41	0.60	-0.17	0.98				
MyHC-I	-0.81	-0.02	0.51	0.86	0.00	0.18	0.31			
MyHC-IIa	-0.57	0.16	0.33	0.53	-0.27	0.62	0.71	0.50		
MyHC-IIx+b	0.77	-0.10	-0.47	-0.77	0.18	-0.50	-0.62	-0.82	-0.90	
Ultimate pH	-0.87	-0.28	0.59	0.95	0.27	0.32	0.40	0.91	0.41	-0.72
IMF	0.26	-0.62	0.21	-0.04	0.48	-0.33	-0.34	-0.01	0.20	-0.13

b) Sensory qualities

Attributes	Tenderness	Juiciness	Beef flavour	Abnormal beef flavour
Juiciness	0.76			
Beef flavour	0.90	0.86		
Abnormal beef flavour	0.19	0.54	0.56	
Overall liking	0.84	0.50	0.81	0.28

c) Sensory qualities and muscle characteristics

	LDH	PFK	ICDH	COX	CS	IMF	Insoluble collagen	Total collagen
Tenderness	0.04	-0.92	0.69	0.29	0.90	0.72	-0.21	-0.20
Juiciness	0.14	-0.45	0.61	0.13	0.44	0.62	-0.25	-0.34
Beef flavour	-0.15	-0.72	0.87	0.41	0.71	0.60	0.05	0.01
Abnormal beef flavour	-0.31	0.06	0.71	0.35	0.03	-0.21	0.39	0.28
Overall liking	-0.45	-0.84	0.85	0.70	0.85	0.42	0.12	0.12

Significant correlations ($P < 0.05$) are shown in bold characters.

Table 3

Regression analyses (optimal models) per gender between sensory qualities and muscle characteristics including within-gender breed effects.

		Equation terms ¹			Partial adjusted R-square (%) ^{Significance}			Total adjusted R-square (%)
	Constant	1 st term	2 nd term	3 rd term	1 st term	2 nd term	3 rd term	
Tenderness								
Heifers	8.5	−2.39 (0.28) LDH	-	-	6.6 **	-	-	6.6 **
Bulls	3.2	+0.02 (0.23) MyHC-IIa	-	-	4.6 *	-	-	4.6 *
Steers	14.1	−1.02 (0.54) BH Breed	−1.88 (0.30) pHu	+0.40 (0.31) CS	14.9 ***	6.9 **	6 *	27.8 ***
Z-scores All animal types ²		+0.16 CS	+0.13 MyHC-IIa	+0.13 IMF	2.1 *	1.4 *	1.3 *	4.8 **
Overall liking								
Heifers	5.0	+0.61 (0.37) AF Breed	−0.27 (0.25) Total collagen	-	13.8 ***	5.4 **	-	19.2 ***
Bulls	3.0	+0.24 (0.24) IMF	-	-	9.0 **	-	-	9 **
Steers	7.6	−1.02 (0.54) BH Breed	−0.17 (0.24) Total collagen	-	35.5 ***	4.0 *	-	39.5 ***
Z-scores All animal types		−0.17 (0.24) Total collagen	+0.13 IMF	-	4.8 **	2.4 **	-	7.2 **

¹ Maximal number of variables allowed was set at three, minimal explanatory power was set at 2% apart for the global models using Z-scores.

² A global model based on Z-scores is presented in bold letters.

Biomarqueurs de la tendreté de la viande bovine

Introduction

La qualité de la viande bovine dépend des caractéristiques sensorielles (tendreté, flaveur, jutosité, couleur, etc.), de la valeur nutritive, de la qualité hygiénique et de la qualité technologique (qui se réfèrent à des paramètres de qualité intrinsèques) ainsi que d'autres facteurs tels que le bien-être des animaux, les conditions environnementales, la traçabilité, etc (qui se réfèrent à des paramètres de qualité extrinsèques). Une des causes majeures de l'insatisfaction des consommateurs est la variabilité élevée et incontrôlée de la qualité sensorielle de la viande, en particulier la tendreté (Verbeke *et al.*, 2010). Par ailleurs, l'autre contrainte est que la qualité intrinsèque de la viande ne peut être déterminée qu'au moment de la consommation, c'est-à-dire après abattage et cuisson, ce qui entrave la production d'une viande de bonne et constante qualité.

Afin de mieux contrôler la qualité sensorielle de la viande bovine, il est aujourd'hui urgent d'avoir des outils prédictifs, notamment de la tendreté. La filière viande bovine est à la recherche d'indicateurs biologiques ou moléculaires pour discriminer les animaux vivants sur la base des paramètres de qualité souhaités, afin d'aider les producteurs de la filière à choisir les systèmes de production les plus appropriés ainsi que les types d'animaux et marchés de commercialisation. Pour atteindre ces objectifs, plusieurs programmes transversaux combinant la génomique, la transcriptomique, la protéomique, la bioinformatique et la biochimie ont été menés au cours de ces deux dernières décennies (Hocquette *et al.*, 2007; Picard *et al.*, 2010; Ouali *et al.*, 2013; Picard *et al.*, 2013; Gagaoua *et al.*, 2014). L'utilisation de la technique d'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE) pour comparer des groupes de tendreté extrêmes (tendre vs. dure) a permis de mettre en évidence et d'identifier une liste de protéines potentiels marqueurs, dont l'abondance est associée à la tendreté (Picard *et al.*, 2010; Picard *et al.*, 2012a,b; Picard *et al.*, 2013). Ces protéines sont représentatives de plusieurs voies métaboliques : des protéines de structure, du métabolisme énergétique, du stress cellulaire et oxydant, de la protéolyse et de la mort cellulaire programmée ou apoptose (Guillemin *et al.*, 2011; Ouali *et al.*, 2013).

L'objectif de la présente étude est de tester le pouvoir prédictif des 21 protéines biomarqueurs les plus fortement associées à la tendreté au sein d'un autre groupe de types d'animaux. Nous avons donc analysé les relations entre l'abondance de ces biomarqueurs et la tendreté (sensorielle, mécanique et indice synthétique) chez trois races à viande de jeunes taurillons qui diffèrent par leur précocité et caractéristiques physiologiques. Il s'agit de i) la Blonde d'Aquitaine, une race fortement musclée et à faibles teneurs en lipides intramusculaires (Listrat *et al.*, 2001), ii) l'Aberdeen Angus connue pour être une race grasse et productrice d'une viande marbrée, et iii) la Limousine aux caractéristiques intermédiaires (Jurie *et al.*, 2011). Deux muscles qui diffèrent dans leurs caractéristiques métaboliques et par leur tendreté, à savoir le *Longissimus thoracis* (entrecôte, plus tendre : muscle à griller) et le *Semitendineux* (rond de gîte, moins tendre) ont été étudiés. Les abondances des 21 protéines ont été quantifiées par la technique immunologique Dot-Blot développée par Guillemin *et al.* (2009) et permettant l'analyse simultanée d'un grand nombre d'échantillons par protéine. Les relations entre les trois estimations de la tendreté et l'abondance relative des 21 protéines biomarqueurs ont été évaluées par le biais d'analyses statistiques multivariées : analyses en composantes principales (ACP) et régressions multiples.

Inverse relationships between biomarkers and beef tenderness according to contractile and metabolic properties of the muscle

B. Picard, **M. Gagaoua**, D. Micol, I. Cassar-Malek, J.F. Hocquette, E.M.C. Terlouw

Publié dans Journal of Agricultural and Food Chemistry (2014) 62, 9808 - 9818

Résumé :

Les récents travaux de protéomique, nous ont permis d'établir une liste de protéines biomarqueurs de la tendreté de la viande. Dans la présente étude, nous avons quantifié l'abondance relative de 21 protéines appartenant à cette liste de biomarqueurs par la technique de Dot-Blot dans les muscles *Longissimus thoracis* (entrecôte) et *Semitendinosus* (rond de gîte) de 71 jeunes taurillons de trois races à viande: Aberdeen Angus (AA), Limousine (LI) et Blonde d'Aquitaine (BA). Pour les deux muscles étudiés, la tendreté a été évaluée par i) analyse sensorielle, ii) mesure instrumentale exprimée par la force de cisaillement de Warner-Bratzler, et iii) un indice synthétique calculé en combinant les mesures sensorielles et mécaniques. Des régressions multiples basées sur les abondances relatives de ces protéines ont été utilisées pour proposer des équations de prédiction et ce, pour les trois estimations de la tendreté. La protéine Hsp70-1A/B ressort comme étant un bon biomarqueur de la dureté chez les trois races et dans les deux muscles. D'autres protéines telles que la lactate déshydrogénase-B, la chaîne lourde de myosine IIx, les petites protéines de stress (*Heat Shock Proteins* : Hsp20, Hsp27 et α B-crystalline) sont liées à la tendreté, mais inversement selon le muscle et la race. Les résultats de cette étude révèlent que la prédiction de la tendreté doit tenir compte des caractéristiques musculaires et métaboliques et du type d'animal.

Mots clés : Biomarqueurs ; tendreté de la viande ; muscle squelettique ; protéines de choc thermique (Hsp) ; prédiction ; dot-blot.

Inverse Relationships between Biomarkers and Beef Tenderness According to Contractile and Metabolic Properties of the Muscle

Brigitte Picard,^{*,†,‡} Mohammed Gagaoua,^{†,§} Didier Micol,^{†,‡} Isabelle Cassar-Malek,^{†,‡} Jean-François Hocquette,^{†,‡} and Claudia E. M. Terlouw^{†,‡}

[†]INRA, UMR 1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès- Champanelle, France

[‡]Clermont Université, VetAgro Sup, UMR 1213 Herbivores, B.P. 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

[§]Equipe Maquav, Laboratoire Bioqual, INATAA, Université Constantine 1, Route de Ain El-Bey, 25000 Constantine, Algeria

ABSTRACT: Previous proteomic analyses established a list of proteins biomarkers of beef tenderness. The present study quantified the relative abundance of 21 of these proteins by dot-blot technique in the Longissimus thoracis and Semitendinosus muscles of 71 young bulls from three breeds: Aberdeen Angus (AA), Limousin (LI), and Blond d'Aquitaine (BA). For both muscles overall tenderness was estimated by sensory analysis; shear force was measured with a Warner–Bratzler instrument, and an index combining sensory and mechanical measurements was calculated. Multiple regressions based on relative abundances of these proteins were used to propose equations of prediction of the three evaluations of tenderness. Hsp70-1B appeared to be a good biomarker of low tenderness in the three breeds and in the two muscles. Proteins such as lactate dehydrogenase-B, myosin heavy chain IIx, and small heat shock proteins (Hsp27, Hsp20, and α B-crystallin) were related to tenderness but inversely according to the muscle and breed. The results demonstrate that prediction of tenderness must take into account muscle characteristics and animal type.

KEYWORDS: biomarkers, beef tenderness, skeletal muscle, heat shock proteins, prediction, dot-blot

■ INTRODUCTION

Beef quality includes sensory quality traits (tenderness, flavor, juiciness, color, etc.), nutritional value, healthiness, and technological quality (which all refer to intrinsic quality traits) as well as issues such as animal welfare, environmental concerns, and traceability (which refer to extrinsic quality traits). A major cause of consumer dissatisfaction is the high and uncontrolled variability in sensory beef quality, especially tenderness.¹ Muscle characteristics (fiber type, collagen, intramuscular lipids) can explain only up to 30% of the variability in tenderness.^{2–4} Another problem is that meat intrinsic quality can only be determined at the time of eating, that is, after slaughter and cooking, which hampers the production of beef of consistent good quality. To better control sensory quality, it is necessary to have tools to predict eating quality, especially tenderness, in live animals. Therefore, the beef sector is looking for biological or molecular indicators to identify live animals with desired quality attributes, to help beef producers to choose the most appropriate production system, animal types, and markets. To meet this objective, several genomics programs combining genomics, transcriptomics, proteomics, computational biology, and biochemistry have been carried out over the past years (for reviews see refs 5–9). Using 2-D electrophoresis techniques, comparisons of two groups of high versus low tenderness allowed the identification of proteins of which abundance was associated with tenderness.^{6,8,10,11} These proteins are representative of several biological functions: muscle structure, contraction, energetic metabolism, cellular stress, and proteolysis.^{7,12} The objective of the present study was to test the predictive power of the 21 proteins most strongly associated with tenderness in another

group of experimental young bulls. To do so, we analyzed the relationships between protein abundances and tenderness in young bulls from three beef breeds differing in their precocity and physiological characteristics. The French Blond d'Aquitaine breed is highly muscled with low intramuscular fat content, and¹³ the Angus breed is known to be fat, producing marbled meat, whereas the Limousin French breed has intermediate properties.¹⁴ Two muscles with differences in metabolic characteristics and tenderness, Longissimus thoracis (LT) and Semitendinosus (ST), were studied. The abundances of the 21 proteins were quantified by the immunological technique dot-blot developed by Guillemain et al.,¹⁵ allowing the simultaneous analysis of large numbers of samples for one protein. Relationships between tenderness traits and protein relative abundance were evaluated using multiple regression analyses.

■ MATERIALS AND METHODS

The study was carried out in compliance with the current French welfare recommendations for the use of experimental animals.

Animals and Samples. The study was conducted using 71 young entire males of three pure breeds: Aberdeen Angus (AA) ($n = 21$), Limousin (LI) ($n = 25$), and Blond d'Aquitaine (BA) ($n = 25$). Animals (12 months old at start) were assigned to a 100 day finishing period before slaughter. They were housed in groups of four animals of the same breed in 6×6 m pens with straw bedding and individually fed and weighed every 2 weeks. Diets consisted of concentrate (75%) and straw (25%). Animals were slaughtered at the same age (around

Received: April 3, 2014

Revised: August 14, 2014

Accepted: August 31, 2014

Published: September 1, 2014

17 months) and final live weight (around 665 kg) to avoid weight and age effects on muscle characteristics and beef meat quality.

All bulls were directly transported in a lorry (3 × 2 m) from the experimental farm to the experimental abattoir situated at 1 km from the rearing building, with two bulls of the same home pen per transport to avoid social isolation stress. After unloading, they were slaughtered within 3 min in the slaughterhouse of INRA institute (Saint-Genès-Champanelle, France) in compliance with the current ethical guidelines for animal welfare. Bulls were stunned by captive bolt prior to exsanguination.

Muscle samples from Longissimus thoracis (LT, mixed fast oxidoglycolytic muscle 23% of type I fibers, 36% IIA, and 39% of IIX) and Semitendinosus (ST, mixed fast glycolytic 8% of type I fibers, 24% of IIA, and 64% of IIX) were excised from the carcass of each animal within 15 min after slaughter. Muscle samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C until protein extraction for protein marker quantification. Samples of the two muscles for sensory evaluation and mechanical measurement were cut into steaks 24 h after slaughter and placed in sealed plastic bags under vacuum and kept between 2 and 4 °C for 14 days for aging, then frozen, and stored at −20 °C until analysis.

Meat Quality Evaluation. LT and ST samples were grilled on a preheated grill at 310 °C, resulting in an internal cooked temperature of 55 °C. For sensory analysis, a trained sensory panel (12 experienced panelists) evaluated the steak samples of the same muscle. The panel evaluated overall tenderness attribute on a continuous and unstructured scale with scores from 0 to 10 (0 = hard, 10 = tender).^{16,17}

Toughness of cooked meat was further evaluated instrumentally by Warner–Bratzler shear force (WBSF) using an Instron 5944 as described by Lepetit and Culioi.¹⁸ Force at rupture during shear compression testing was expressed in N/cm².

Sensory and mechanical values of tenderness were used to compute a synthetic tenderness index by combining standardized normal sensory and mechanical tenderness/toughness values.¹⁹ This was calculated for each muscle as the difference within each breed between the standardized values of tenderness score minus the standardized value of the WBSF measure. This index was suggested to take into account the very close genetic correlation underlying the moderate phenotypic correlation observed between both traits,²⁰ suggesting both traits are under the control of common genes.

Dot-Blot Analysis. The 21 proteins analyzed are described in Table 1. The conditions for use and specificity of primary antibodies against these 21 proteins in bovine muscle have been determined previously by Guillemin et al.²¹ using Western blot techniques (Table 2).

Total protein extractions were performed according to the method of Bouley et al.²² in a denaturation extraction buffer (8.3 M urea, 2 M thiourea, 1% DTT, 2% CHAPS). The protein concentration was determined using the Bradford protein assay.²³ Protein extractions were stored at −20 °C.

Relative abundances of proteins were evaluated following the dot-blot technique as described by Guillemin et al.²¹ Briefly, protein samples were spotted in quadruplicate on a nitrocellulose membrane with the Minifold I dot blot from Schleicher & Schuell Biosciences (Germany) and hybridized with the specific antibody of each protein, with conditions described in Table 2. Secondary fluorescent-conjugated IRDye 800CW antibodies (anti-mouse, anti-sheep, and anti-rabbit) were supplied by LI-COR Biosciences (Lincoln, NE, USA) and used at 1/20000. Subsequently, membranes were scanned by an Odyssey (LI-COR Biosciences) scanner at 800 nm. Protein relative abundance for each sample, given in arbitrary units, was normalized by comparison to a reference sample constituted by mixing all samples from young bulls from this experiment in equal proportions. The technical coefficient of variation of this technique is on average 9%.²¹

Statistical Analysis. Analysis of variance was performed using the GLM procedure of SAS for repeated measures (version 9.1, 2002; SAS Institute Inc.). The effects of breed, muscle type (LT vs ST), and breed × muscle type interaction are reported. When significant effects were detected, differences were evaluated by the PDIF option of SAS.

Table 1. 21 Protein Biomarkers of Beef Tenderness Investigated in This Study^a

protein name	gene	UniProt ID
hea shock proteins		
αB-crystallin	CRYAB	P02511
Hsp20	HSPB6	O14558
Hsp27	HSPB1	P04792
Hsp40	DNAJA1	P31689
Hsp70-1A/B	HSPA1B	P08107
Hsp70-8	HSPA8	P11142
Hsp70-Grp75	HSPA9	P38646
metabolism		
Eno3 (enolase 3)	ENO3	P13929
LDH-B (lactate dehydrogenase chain B)	LDHB	P07195
MDH1 (malate dehydrogenase 1)	MDH1	P40925
structure		
CapZ-β (F-actin-capping protein subunit β)	CAPZB	P47756
α-actin	ACTA1	P68133
MyLC-1F (myosin light chain 1F)	MYL1	P05976
MyBP-H (myosin binding protein H)	MYBPH	Q13203
MyHC-I (myosin heavy chain-I)	MYH7	P12883
MyHC-II (MyHC IIA + IIX + IIB)	MYH2	Q9UKX2
MyHC-IIx (myosin heavy chain-IIx)	MYH1	P12882
oxidative resistance		
DJ-1 (Parkinson disease protein 7)	PARK7	Q99497
PRDX6 (cis-peroxiredoxin)	PRDX6	P30041
SOD1 (superoxide dismutase Cu/Zn)	SOD1	P00441
proteolysis		
μ-calpain	CAPN1	P07384

^aProtein biomarkers of beef tenderness established by our group in previous proteomic studies (for reviews see Guillemin et al.,²⁷ and Picard et al.^{6,8,10,11}).

Principal component analyses (PCAs) were performed using the factor procedure of SAS to study the overall relationships between the studied variables (tenderness traits and protein relative abundances).

Multiple regression analyses were carried out using XLStat 2009 software to explain overall tenderness, WBSF, and tenderness index traits for the two muscles separately, presenting the 21 protein biomarkers as potential explanatory variables, as well as breed. The “optimal model” explaining maximal variability option was used with “maximal four variables”. The percentage of variability in meat quality parameter explained by proteins is based on the adjusted *r*² value of the regression analysis × 100%.

Absence of collinearity was verified for each model. Condition indices and variance proportions were produced using the COLLIN option of SAS, with components identified as collinear if they possessed both a high condition index >10 and a proportion of variation >0.5 for two or more variables.

RESULTS

Tenderness Traits. The values of tenderness evaluated in three ways are presented in Table 3. For the LT muscle, significant breed effects were found for overall tenderness only, AA bulls being more tender than BA and LI bulls (Table 3). In the ST muscle, significant differences between breeds were observed for the WBSF and the tenderness index. A significant muscle × breed interaction was observed for the WBSF and the tenderness index, Limousin ST muscle being tougher than BA, whereas AA had intermediate values (Table 3). Overall tenderness (Table 3) was much higher in the LT. For the WBSF, this was only a tendency.

Table 2. Suppliers and Conditions for Each Primary Antibody Used in This Study

target protein	antibody references	dilution ^a
heat shock proteins		
α B-crystallin	monoclonal anti-bovine assay designs SPA-222	1/500
Hsp20	monoclonal anti-human Santa Cruz HSP20-11:SC51955	1/200
Hsp27	monoclonal anti-human Santa Cruz HSP27 (F-4):SC13132	1/3000
Hsp40	monoclonal anti-human Santa Cruz HSP40-4 (SPM251):SC-56400	1/250
Hsp70-1A/B	monoclonal anti-human Abnova HSPA1B (M02), clone 3B7	1/2000
Hsp70-8	monoclonal anti-bovine Santa Cruz HSC70 (BRM22):SC-59572	1/250
Hsp70-Grp75	monoclonal anti-human RD systems clone 419612	1/250
metabolism		
Eno3	monoclonal anti-human Abnova Eno3 (M01), clone 5D1	1/45000
LDH-B	monoclonal anti-human Novus LDHB NB110-57160	1/50000
MDH1	monoclonal anti-pig Rockland 100-601-145	1/1000
structure		
CapZ- β	monoclonal anti-human Abnova CAPZB (M03), clone 4H8	1/250
α -actin	monoclonal anti-rabbit Santa Cruz α -actin (SC5):SC-58670	1/1000
MyLC-1F	polyclonal anti-human Abnova MYL1 (A01)	1/1000
MyBP-H	monoclonal anti-human Abnova MYBPH (M01), clone 1F11	1/4000
MyHC-I	monoclonal anti-bovine Biocytex 5B9	1/2000
MyHC-II ^b	monoclonal anti-bovine Biocytex 1SF4	1/4000
MyHC-IIx	monoclonal anti-bovine Biocytex 8F4	1/500
oxidative resistance		
DJ-1	polyclonal anti-human Santa Cruz DJ-1 (FL-189):SC-32874	1/250
PRDX6	monoclonal anti-human Abnova PRDX6 (M01), clone 3A10-2A11	1/500
SOD1	polyclonal anti-rat Acris SOD1 APO3021PU-N	1/1000
proteolysis		
μ -calpain	monoclonal anti-bovine Alexis μ -calpain 9A4H8D3	1/1000

^aDilution of each antibody was defined according to Guillemain et al.²⁷^bMyHC II corresponds to fast MyHC: IIa+IIx+IIb isoforms.

Protein Relative Abundances. Significant breed effects were found for at least one of the two muscles for most of the proteins except for Hsp70-1B, MyBP-H, and SOD1 (Table 4). The two muscles of AA bulls presented higher levels of α B-crystallin, Hsp27, Eno3, and PRDX6 and lower levels of MyHC-IIx. Most proteins showed an effect of muscle or a muscle $\times$ breed interaction, apart from MyLC-1F, MyBP-H, SOD1, and μ -calpain (Table 4).

Relationships between Biomarkers and Tenderness Traits. *Descriptive Analysis.* The PCA illustrating the relationships between relative abundances of protein biomarkers and tenderness traits evaluated by (i) sensory analysis (overall tenderness), (ii) Warner–Bratzler shear force (WBSF), and (iii) tenderness index are presented in Figure 1. In the two muscles, overall tenderness and tenderness index were positively correlated, and both were negatively correlated with the WBSF.

(a) *LT Muscle.* As illustrated in Figure 1a, high overall tenderness scores were positively associated with small Hsp proteins (Hsp27, Hsp20, α B-crystallin), Eno3, structural protein CapZ- β , and antioxidants PRDX6 and DJ-1 when considered across breeds. Low tenderness scores were associated with proteins of the Hsp70 family (Hsp70-8, Hsp70-1A/B, and Hsp70/Grp75) or related to fast glycolytic muscle fibers (e.g., LDH-B, MyHC-IIx). The average loadings of the different breeds (Figure 1b) differed on the first axis (BA < LI < AA; $P = 0.0001$), and on the second axis, the AA bulls differed from the other breeds (AA > LI, BA; $P = 0.001$). Compared to LI and BA, LT muscles of AA bulls were characterized by higher abundances of small Hsp (Hsp27, Hsp20, α B-crystallin), Hsp40, Eno3, CapZ- β , PRDX6, and DJ-1 and lower abundances of LDH-B and MyHC-IIx (cf. Table 4).

(b) *ST Muscle.* In the ST muscles, overall tenderness scores were positively associated with LDH-B and MyHC-IIx (Figure 1c) and negatively with small Hsps (Hsp27, Hsp20, α B-crystallin), Hsp40, Eno3, MyHC-I, CapZ- β , PRDX6, and DJ-1. On the first axis (Figure 1d), AA differed significantly ($P < 0.0001$) from the other breeds (LI, BA < AA), and on the second axis all breeds differed significantly (AA < LI < BA; $P < 0.01$). As in the LT, AA were characterized by higher abundances of small Hsp, Hsp40, Eno3, MyHC-I, CapZ- β , PRDX6, and DJ-1 and lower abundances of LDH-B and MyHC-IIx.

(c) *Comparison of the PCAs of the LT and ST Muscles.* The PCA demonstrates inverse relationships between some proteins

Table 3. Effect of Breed and Muscle on Beef Tenderness Trait Evaluated Using Three Analysis Methods

variable	muscle	breed (B) ^a				muscle (M) ^c		significance ^d		
		AA 21	BA 25	LI 25	SEM ^b	LT 70	ST 68	B	M	B $\times$ M
overall tenderness	LT ^e	5.27a	4.85b	4.75b	0.08	4.94a	4.58b	*	**	ns
	ST	4.58	4.66	4.49	0.05			ns		
WBSF ^f	LT	40.62	44.24	41.69	1.27	42.27	44.90	ns	t	*
	ST	45.91ab	41.35b	47.80a	1.01			*		
tenderness index	LT	0.67	−0.14	−0.26	0.20	0.04	−0.03	ns	ns	*
	ST	−0.14ab	0.58a	−0.56b	0.18			*		

^aBreed designation: AA, Aberdeen Angus; BA, Blond d'Aquitaine; LI, Limousin. ^bStandard error of mean. ^cMuscle designation: LT, Longissimus thoracis; ST, Semitendinosus. ^dt, <0.1; *, <0.05; **, <0.001. ^eLeast-square means in the same row for breed and muscle effects not followed by a common letter (a, b) differ significantly: $P < 0.05$. ^fWarner–Bratzler shear force test.

Table 4. Breed, Muscle, and Breed × Muscle Interaction Effects on the 21 Protein Biomarkers of Beef Tenderness

variable	muscle	breed (B) ^a			SEM ^b	muscle (M) ^c		significance ^d		
		AA 21	BA 25	LI 25		LT 71	ST 69	B	M	B × M
α B-crystallin ^e	LT	26.5a	16.1b	18.4b	0.84	20.0a	8.9b	***	***	*
	ST	12.5a	7.0b	7.9b	0.45			***		
Hsp20	LT	20.2	17.5	17.9	0.51	18.5a	13.2b	t	***	ns
	ST	13.6	12.9	13.3	0.35			ns		
Hsp27	LT	28.7a	19.0b	21.4b	1.08	22.7a	16.0b	**	***	ns
	ST	21.0a	13.7b	14.3b	0.60			***		
Hsp40	LT	18.1a	17.1ab	16.1b	0.26	17.0a	13.0b	**	***	ns
	ST	13.8	12.8	12.6	0.22			*		
Hsp70-1A/B	LT	17.6	17.8	19.3	0.46	18.3a	12.5b	ns	***	ns
	ST	12.0	12.6	12.8	0.29			ns		
Hsp70-8	LT	15.8b	17.5a	16.6ab	0.22	16.7a	15.6b	*	**	ns
	ST	15.0	16.0	15.8	0.19			t		
Hsp70/Grp75	LT	9.1c	16.6a	12.6b	0.44	13.0	12.6	***	ns	***
	ST	13.3	12.6	12.0	0.24			ns		
Eno3	LT	17.5a	14.9ab	13.4b	0.56	15.1a	13.4b	*	*	ns
	ST	15.5a	13.3b	12.9b	0.35			**		
LDH-B	LT	10.2c	19.1a	14.2b	0.59	14.7	13.4	***	t	**
	ST	11.2c	15.0a	13.5b	0.33			***		
MDH1	LT	12.3b	15.4a	14.1ab	0.45	14.1	14.9	*	ns	*
	ST	15.4	15.1	14.2	0.37			ns		
CapZ- β	LT	19.3a	15.9b	15.4b	0.42	16.7a	14.0b	**	***	*
	ST	14.9	13.4	13.8	0.28			ns		
α -actin	LT	16.9b	19.5a	16.3b	0.40	17.6	17.6	**	ns	**
	ST	17.5	17.4	17.9	0.31			ns		
MyLC-1F	LT	14.9ab	15.5a	14.3b	0.20	14.9	15.2	*	ns	ns
	ST	15.0	15.7	15.0	0.18			ns		
MyBP-H	LT	14.9	13.3	13.7	0.84	14.0	12.7	ns	ns	ns
	ST	13.8	12.4	12.0	0.36			ns		
MyHC-I	LT	17.7	16.9	18.4	0.33	17.7a	12.4b	ns	***	**
	ST	14.3a	10.2c	12.4b	0.35			***		
MyHC-II	LT	13.7c	16.5a	15.0b	0.30	15.1b	16.8a	**	***	*
	ST	16.3	16.9	17.2	0.22			ns		
MyHC-IIx	LT	4.2c	23.3a	14.3b	1.08	14.5b	24.34a	***	***	**
	ST	18.4c	28.6a	24.8b	0.74			***		
DJ-1	LT	17.1	16.0	16.6	0.33	16.5a	13.5b	ns	***	ns
	ST	14.6a	13.1b	13.0b	0.26			*		
PRDX6	LT	15.5a	13.4b	13.3b	0.22	14.0b	16.1a	***	***	ns
	ST	17.7a	15.6b	15.2b	0.23			***		
SOD1	LT	17.6	15.8	15.6	0.42	16.3	16.7	ns	ns	ns
	ST	16.1	10.2	12.4	1.22			ns		

Table 4. continued

variable	muscle	breed (B) ^a			SEM ^b	muscle (M) ^c		significance ^d		
		AA 21	BA 25	LI 25		LT 71	ST 69	B	M	B × M
μ -calpain	LT	14.2b	15.9a	14.0b	0.28	14.7	14.4	**	ns	ns
	ST	13.6b	15.2a	14.1ab	0.26			*		

^aBreed designation: AA, Aberdeen Angus; BA, Blond d'Aquitaine; LI, Limousin. ^bStandard error of mean. ^cMuscle designation: LT, Longissimus thoracis; ST, Semitendinosus. ^dt, <0.1; *, <0.05; **, <0.001; ***, <0.0001. ^eLeast-squares means in the same row for breed and muscle effects not followed by a common letter (a–c) differ significantly: $P < 0.05$.

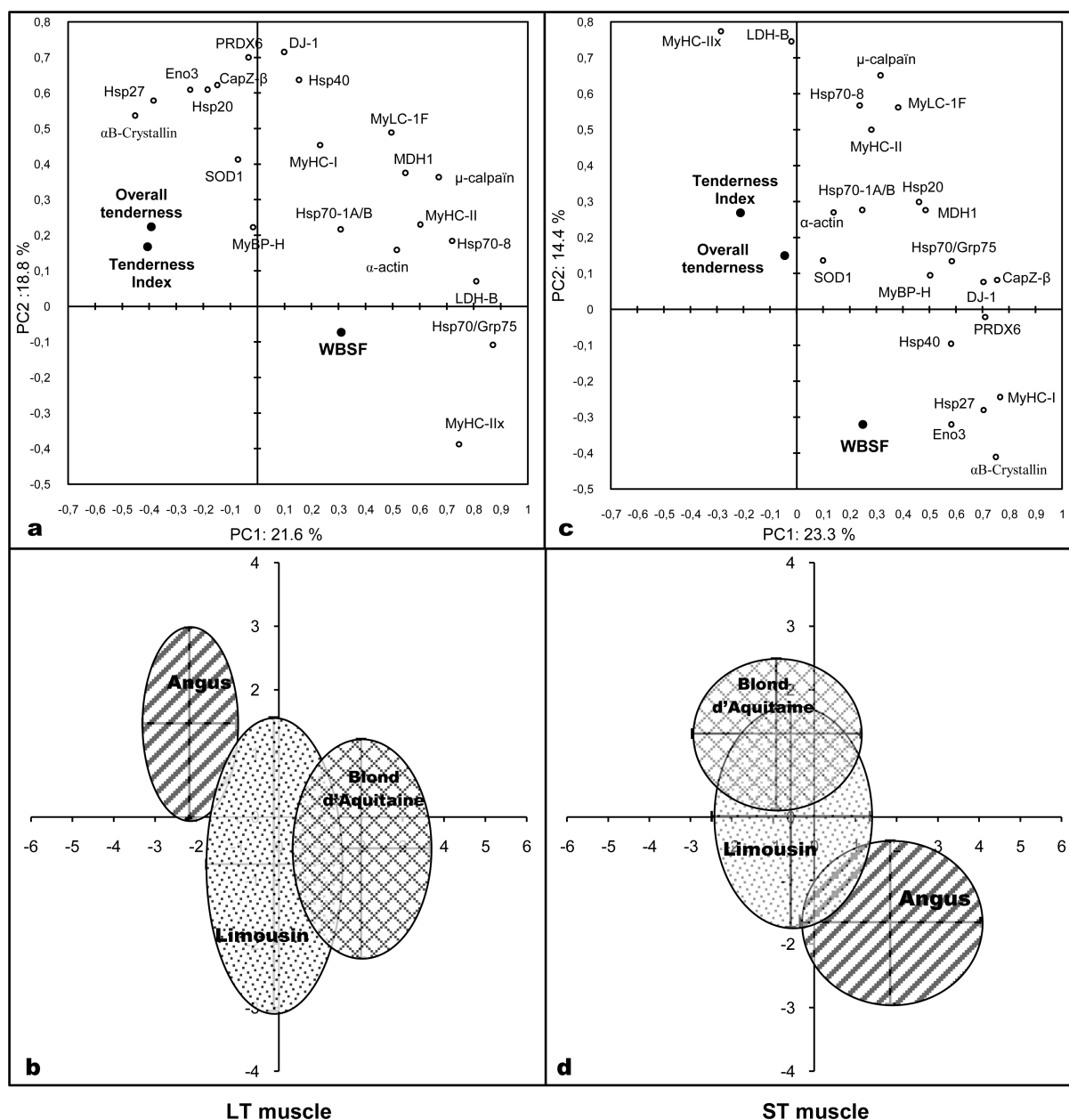


Figure 1. Principal component analysis: (a, c) distribution of protein abundance and meat tenderness traits (overall tenderness, WBSF, and tenderness index) for the LT and ST muscles, respectively; (b, d) distribution of the three breeds on the first two principal axes (mean $\pm$ standard errors) for LT and ST muscles, respectively.

and tenderness in the two muscles. MyHC-IIx and LDH-B were positively associated with tenderness in ST muscle and negatively in LT. In contrast, proteins from the small Hsp family, Eno3, Hsp40, CapZ- β , PRDX6, and DJ-1, were negatively correlated with tenderness in ST and positively in

LT muscle. In addition, the graphs show that the Angus breed was associated with high tenderness values in LT muscle and with low tenderness in the ST muscle.

Regression Analyses. Multiple regression analyses carried out on the pooled data of the three breeds showed that, for the

Table 5. Equations of Best Models (Parameters Including the Direction and Level of Significance) To Predict Overall Tenderness across Breeds and for Each Breed

breed ^a	parameter 1	P value ^b	parameter 2	P value	parameter 3	P value	parameter 4	P value	predictive power ^c	P value model
Semitendinosus Muscle										
AA	+ PRDX6	**	− Eno3	*	− α -actin	§			43	*
BA	− Hsp70-1A/B	*	+ replicate	*					39	*
LI	+ MyHC-II	***	− PRDX6	**	+ Hsp70/Grp75	‡			53	**
all breeds	− Hsp20	*	+ LDH-B	§	+ PRDX6	§	− Hsp70-1A/B	*	14	*
Longissimus thoracis Muscle										
AA	− MyLC-1F	**	+ MyHC-IIx	§	+ replicate	‡			35	§
BA	+ DJ-1	***	− MyBP-H	§	+ replicate	*			40	*
LI	− Hsp70-1A/B	*	+ MyLC-F1	*					35	*
all breeds	− MyHC-IIx	§	+ Hsp20	§	− Hsp70-1A/B	§			17	*

^aBreed designation: AA, Aberdeen Angus; BA, Blond d'Aquitaine; LI, Limousin. ^bSignificance of differences: ‡, $P = 0.06$; §, $P < 0.05$; *, $P < 0.01$; **, $P < 0.001$; ***, $P < 0.0001$. ^c(%) of variability between animals explained by the model.

Table 6. Equations of Best Models (Parameters Including the Direction and Level of Significance) To Predict WBSF across Breeds and for Each Breed

breed ^a	parameter 1	P value ^b	parameter 2	P value	parameter 3	P value	predictive power ^c	P value model
Semitendinosus Muscle								
AA	− α B-crystallin	§	+ Eno3	*	+ Hsp70-1A/B	§	36	§
BA	− MyHC-IIx	±	+ Eno3	‡	− α -actin	§	22	§
LI	− MyHC-IIx	*	− MyHC-II	§	− replicate	***	60	***
all breeds	− MyHC-IIx	*	+ Hsp70-1A/B	§			15	*
Longissimus thoracis Muscle								
AA								
BA	− α -actin	§					21	§
LI	+ LDH-B	**	− MDH1	**	+ Hsp70-1A/B	**	60	***
all breeds	+ Hsp70-1A/B	*	+ replicate	§			10	*

^aBreed designation: AA, Aberdeen Angus; BA, Blond d'Aquitaine; LI, Limousin. ^bSignificance of differences: ‡, $P = 0.1$; §, $P < 0.05$; *, $P < 0.01$; **, $P < 0.001$; ***, $P < 0.0001$. ^cPercent of variability between animals explained by the model.

Table 7. Equations of Best Models (Parameters Including the Direction and Level of Significance) To Predict Tenderness Index across Breeds and for Each Breed

breed ^a	parameter 1	P value ^b	parameter 2	P value	parameter 3	P value	parameter 4	P value	predictive power ^c	P value model
Semitendinosus Muscle										
AA	+ α B-crystallin	§	+ PRDX6	§	− Eno3	*			47	*
BA	− Hsp70-1A/B	§	+ replicate	§					24	*
LI	− α B-crystallin	*	+ Hsp40	*	+ MyHC-II	**	− PRDX6	**	73	***
all breeds	+ MyHC-IIx	§	+ replicate	*					12	*
Longissimus thoracis Muscle										
AA	− Eno3	§	+ Hsp27	*	− CapZ- β	+			29	*
BA	− CapZ- β	§	+ Hsp40	‡	+ α -actin	*	− Hsp70-8	*	28	§
LI	− LDH-B	***	+ MDH1	**	+ CapZ- β	*	− Hsp70-1A/B	***	66	***
all breeds	+ α -actin	§	− Hsp70-1A/B	*	− MyHC-IIx	*			17	**

^aBreed designation: AA, Aberdeen Angus; BA, Blond d'Aquitaine; LI, Limousin. ^bSignificance of differences: ‡, $P = 0.1$; §, $P < 0.05$; *, $P < 0.01$; **, $P < 0.001$; ***, $P < 0.0001$. ^cPercent of variability between animals explained by the model.

LT and ST muscles, the proteins explained only 10–17% of the variability of the three tenderness measurements (Tables 5–7). The models for overall tenderness retained (Table 5) LDH-B, PRDX6, Hsp20, and Hsp70-1A/B for the ST muscle and Hsp20, MyHC-IIx, and Hsp70-1B for the LT muscle. The models for WBSF retained Hsp70-1B for the two muscles and MyHC-IIx for the ST muscle (Table 6). The models of the tenderness index retained MyHC-IIx for the ST and LT muscles. The LT tenderness index was further correlated with α -actin and with Hsp70-1A/B (Table 7).

When breeds were considered separately, the prediction power (adjusted r^2) improved, although it varied according to breed and tenderness measurement (Tables 5–7). The models for LI bulls had the most predictive power. The model of overall tenderness of the ST muscle of LI bulls retained (Table 5) fast MyHC, Hsp70/Grp75, and PRDX6, explaining 53% of the variability between animals. MyLC-1F and Hsp70-1A/B explained 35% of variability in overall tenderness of the LT muscle between LI bulls. The model for WBSF explained even 60% of the variability of the LI breed in both muscles (Table 6). Proteins retained in the models were MyHC-IIx and -II for

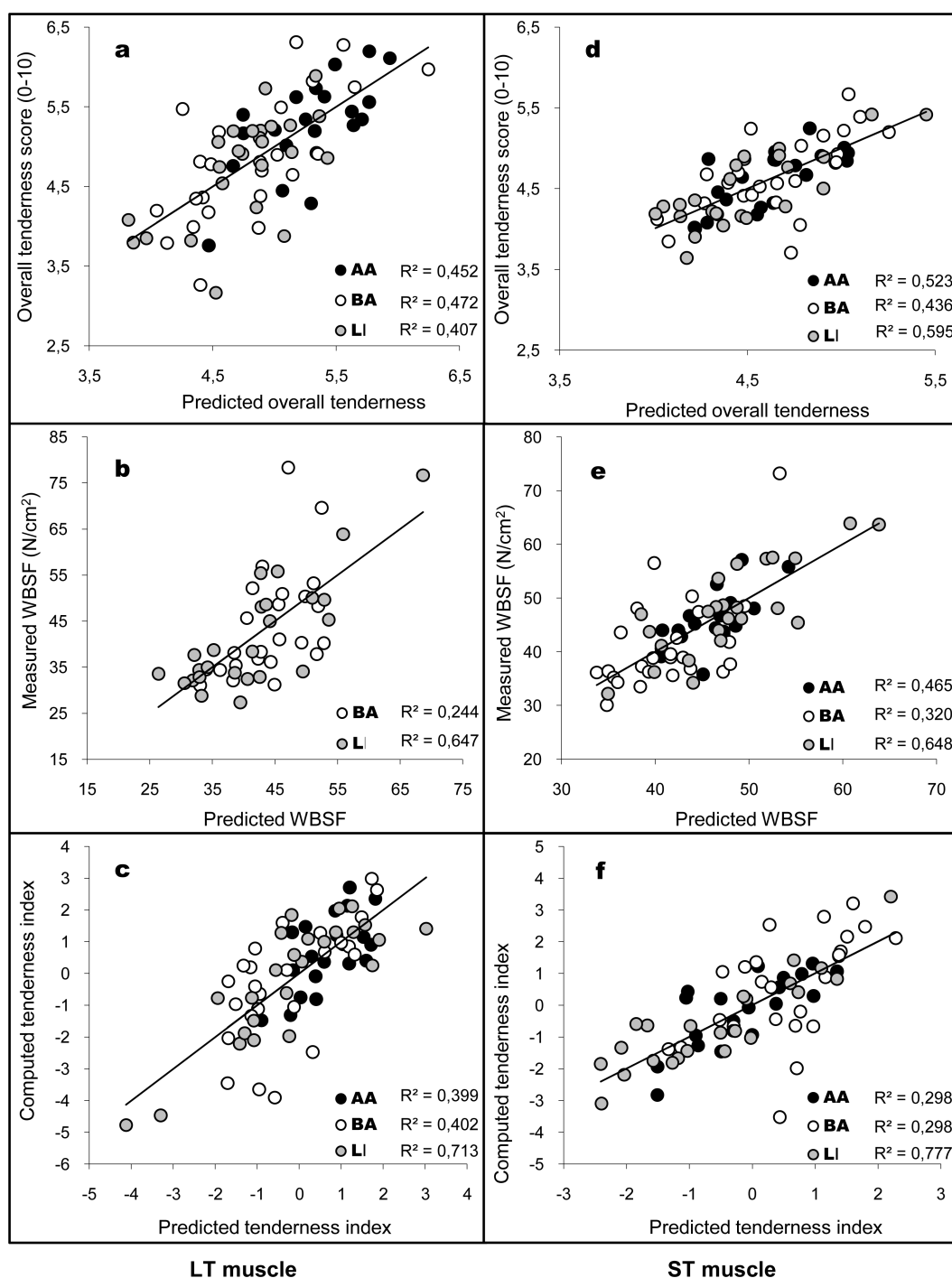


Figure 2. Correlations between predicted and measured beef tenderness traits (for tenderness, WBSF, and tenderness index) using best models for the three breeds among LT (a–c) and ST muscles (d–f). Adjusted r -squares corresponding to the prediction equations shown in Tables (5–7) for each breed are given. Breed designation: AA, Aberdeen Angus; BA, Blond d'Aquitaine; LI, Limousin.

the ST muscle and LDH-B, Hsp70-1A/B, and MDH1 for the LT muscle (Table 6). The model for the tenderness index for both muscles had high predictive power, explaining 73 and 66% of the variability for the ST and LT, respectively (Table 7).

Correlations between predicted and measured values for each tenderness trait among the two studied muscles are shown (Figure 2).

For the AA bulls, none of the 21 quantified protein biomarkers could predict the WBSF of the LT muscle (Table 6). In the ST muscle, the WBSF was predicted by Eno3 and

Hsp70-1A/B (positively) and by α B-crystallin (negatively). Overall tenderness and tenderness index were better predicted in the ST than in the LT muscle.

For the BA bulls, prediction powers were similar in the two muscles with better prediction for overall tenderness by Hsp70-1A/B (negatively) in ST and by DJ-1 (positively) and MyBP-H (negatively) in LT muscle (Table 5). The predictions of WBSF and tenderness index were lower than in the two other breeds (Tables 6 and 7).

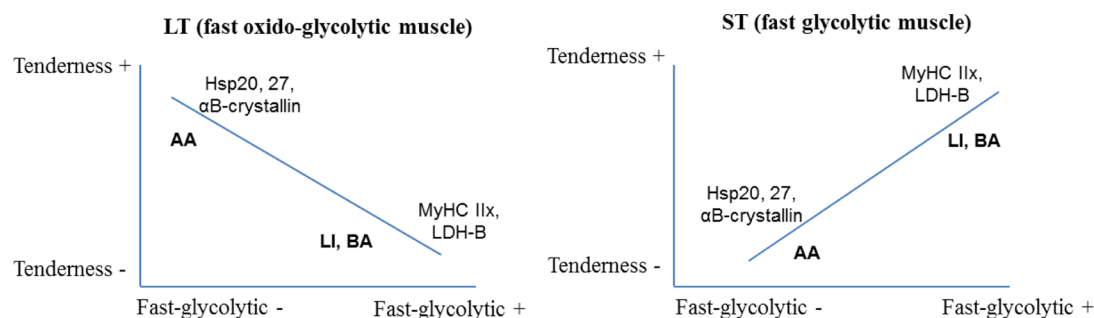


Figure 3. Schematic illustration of the relationships between muscle metabolic and contractile properties and tenderness depending on the muscle. (Left) For the Longissimus thoracis (fast oxido-glycolytic muscle), higher degrees of fast glycolytic properties are associated with lower tenderness. (Right) For the Semitendinosus (fast glycolytic muscle) higher degrees of fast glycolytic properties are associated with higher tenderness. Consequently, biomarkers associated with contractile and metabolic properties of the muscles such as MyHC IIx and LDH-B are positively or negatively associated with tenderness of the ST and LT muscles, respectively. The opposite is found for other biomarkers such as small Hsps (Hsp20, Hsp27, α B-crystallin). ST and LT muscles from Angus breed (AA) have lower levels of fast glycolytic properties than those of Limousin (LI) and Blond d'Aquitaine (BA) breeds. Therefore, their LT and ST muscles are more and less tender, respectively, than those of the LI and BA breeds.

Overall, the results demonstrate that among the 21 quantified proteins, Hsp70-1A/B was often retained in the prediction models of the different breeds and negatively correlated with the different tenderness measurements in both muscles. Proteins representing fast glycolytic fiber types such as MyHC-IIx or LDH-B were correlated with tenderness in the two muscles for the three tenderness traits, but the direction of the correlation depended on the muscle, as also illustrated in the PCA (Figure 1): they were positively correlated with tenderness measurements in the ST and negatively correlated in the LT muscle. The glycolytic Eno3 enzyme was correlated with the three tenderness indicators in the ST muscle of the AA bulls. PRDX6 was correlated with ST overall tenderness and tenderness index but never with WBSF.

DISCUSSION

The first objective of this study was to determine in two different muscles of young Aberdeen Angus, Limousin, and Blond d'Aquitaine bulls the relationships between tenderness indicators and several protein biomarkers previously identified as good predictors of meat tenderness.⁶ The second objective was to propose prediction equations of tenderness based on the abundances of the biomarkers. Among the quantified proteins, Hsp70-1A/B was the only protein associated with the different tenderness indicators in the two muscles and the three breeds. Other proteins including LDH-B, MyHC-IIx, and various small Hsps were associated with tenderness, but oppositely in the ST compared to the LT muscle. These data suggest that different mechanisms underlie tenderness, some which are common between both muscles, whereas others differ. The underlying mechanisms appear to be related to the contractile and metabolic properties of the muscle, and they differ in the sense that the direction of the correlation with tenderness depends on the muscle.

Muscle- and Breed-Specific Biomarkers of Tenderness. Our findings show that MyHC-IIx and LDH-B are positively and negatively correlated with tenderness of the ST muscle (fast glycolytic) and LT muscle (fast oxido-glycolytic), respectively. These opposite correlations are in agreement with earlier studies. For example, Chaze et al.¹⁹ showed in young bulls from three main French beef breeds that in the LT muscle several proteins representing fast glycolytic properties were negatively correlated with tenderness and several proteins

corresponding to slow oxidative properties were positively correlated with tenderness. Studying the same muscle in young Blond d'Aquitaine, Morzel et al.²⁴ found succinate dehydrogenase, an oxidative enzyme, to be a good marker of tenderness. In Charolais young bulls, fast proteins such as Troponin T fast isoforms, phosphoglucosmutase, fast MyHC, and glycogen phosphorylase were found to be potential biomarkers of toughness, and slow MyHC, ATP synthase β , and ApoBEC were associated with increased tenderness.¹² Other studies based on fiber types and enzyme activities showed positive relationships between slow oxidative fiber types and tenderness in the LT and a negative relationships in the ST muscle.² This was further confirmed in a meta-analysis combining more than 332,000 data on fiber types and enzyme activities of these two muscles in several types of cattle.⁴ The present results indicate also that in the case of a fast glycolytic muscle such as ST, muscles containing a greater proportion of fast glycolytic fibers will produce more tender meat and, in the case of a more oxidative muscle such as LT, muscles containing a greater proportion of slow oxidative fibers will produce more tender meat. In the present study, LT meat of AA bulls was more tender and ST meat was less tender compared to the LI and BA breeds. This is coherent with the opposite correlations described above. Irrespective of breed, for the LT muscle, the more glycolytic it is, the less tender it is, and for the ST muscle, the more glycolytic it is, the more it is tender. The LT of AA was less glycolytic compared to the other breeds and, consequently, more tender. The ST of AA was less glycolytic compared to the other breeds and, consequently, less tender. Other factors, such as lipid content, may of course also play a significant role.

The positive correlation between MyHC-IIx and tenderness observed in the LT muscle of the AA bulls may seem to contrast with the above idea. Other authors found similarly positive relationships between fast glycolytic type and tenderness in LT muscle from animals with muscles with oxidative characteristics. For example, D'Allessandro et al.²⁵ in Longissimus dorsi from Chianina beef cattle observed that the tender meat group on the basis of WBSF was characterized by higher levels of glycolytic enzymes.

Overall, existing results demonstrate that the contractile and metabolic properties of muscle play a major role in the elaboration of tenderness.

The present study found other opposite associations between proteins and tenderness according to the muscle or breed. Thus, proteins from the small Hsp family (Hsp20, Hsp27, and α B-crystallin) were inversely associated with tenderness depending on the two muscles. These proteins were negatively associated with tenderness in the ST muscle and positively in the LT muscle. These data are in agreement with the results of Guillemain et al.,²⁶ who demonstrated that in the ST muscle, Hsp from both the Hsp70 family and small sHsp family were inversely correlated with tenderness as observed in the present study. Nevertheless, these Hsps were not correlated with tenderness of the LT muscle. In a previous experiment with Blond d'Aquitaine young bulls, we found inverse relationships between sHsp abundances and tenderness in ST and LT muscles.¹⁰ This could demonstrate that the functions of sHsp depend on the contractile and metabolic properties of the muscle. Guillemain et al.²⁷ showed that slow oxidative fibers have the highest abundance of α B-crystallin. This is in accordance with our data showing higher abundances in LT than in ST muscle and earlier data reported by Guillemain et al.²⁶ showing higher abundances in Charolais young bulls and AA than in LI and BA.

Overall, these results allow understanding why the correlations between one biomarker and tenderness could be reversed as described in the literature. Our results give explanations as described in Figure 3. These relationships according to muscle and breed types need to be confirmed in other muscles and animal types.

In the present study, PRDX6, an antioxidant enzyme, was associated with tenderness mainly of the ST muscle, but in opposite directions, depending on the breed. This is in accordance with earlier results. Guillemain et al.²⁷ found that PRDX6 is a biomarker of low tenderness of the ST muscle in young Charolais bulls, whereas Jia et al.²⁸ reported an overexpression of PRDX6 in tender meat in young Norwegian Red bulls. The antioxidant action of PRDX6 is based on the hydrolysis of hydrogen peroxides and facilitation of the repair of damaged cell membranes via reduction of peroxidized phospholipids.^{7,29} Antioxidant enzymes such as PRDX6 and also SOD1 are involved in the protection of the cell against oxidative stress, which is causal of free radicals of oxygen, resulting in the formation of protein aggregates.³⁰ These aggregates may hamper the tenderization process of the meat. In agreement with this finding, D'Alessandro et al.²⁵ proposed that oxidative stress promotes meat tenderness and elicits heat shock protein responses. Ouali and co-workers^{7,31} proposed that the first step of the conversion of muscle into meat is the onset of apoptosis. This death process is energy dependent and involves a large number of proteins including Hsp families. D'Alessandro et al.²⁵ discusses the possible causes of opposite relationships between abundances of oxidative enzymes and tenderness. The authors speculate that post-mortem metabolism in tender and tough meat is subtly modulated via higher levels of specific enzymes and amino acidic residue phosphorylation in a breed-specific fashion. Results of the present study showing that PRDX6 is positively associated with overall tenderness in AA and negatively in LI young bulls are in accordance with this suggestion. Guillemain et al.²⁷ showed that the relationship between antioxidant enzymes such as PRDX6 and also SOD1 was more significant in Charolais steers than in young bulls, suggesting that gender may also play a role. They showed that SOD1 was correlated with tenderness only in

steers, which may explain the absence of an association between tenderness and SOD1 in the present study.

Overall, these data demonstrate that the contractile and metabolic properties of muscles play a major role in the elaboration of tenderness. It is likely that mechanisms underlying the determinism of tenderness involve several biological processes such as apoptosis, oxidative stress, and proteolysis, which depend probably on these muscle properties.

Hsp70-1A/B Is a Good Candidate Biomarker of Meat Tenderness in the Three Breeds. Proteins from the Hsp70 family (Hsp70-1A/B, Hsp70-8, GRP 75) were recently found to be related to tenderness.⁸ In the present study, among Hsp70s, only Hsp70-1A/B (gene HSPA1B), also called Hsp70-2 depending on species, was negatively associated with overall tenderness and tenderness index and positively with WBSF in the two muscles across the three breeds.

The members of the Hsp70 family serve a variety of roles: (i) they act as molecular chaperones facilitating the assembly of multiprotein complexes, (ii) they participate in the translocation of polypeptides across cell membranes and to the nucleus, and (iii) they help in the proper folding of nascent polypeptide chains.³² In the Diaphragma muscle from Holstein–Friesian cattle, Sugimoto et al.³³ showed that misfolding of energy-related proteins due to Hsp70 deficiency might lead to protein aggregation and muscle fiber degeneration. This is in coherence with the negative association with tenderness observed in the present study. Moreover, the study of Crawford and Horowitz³⁴ showed that, in particular, scaffolding proteins and chaperone proteins such as Hsp90 and Hsp70 are required for individual steps in the assembly of myofibril. The study of Miyabara et al.³⁵ showed that Hsp70 improves structural and functional recovery of skeletal muscle after disuse atrophy. This is in agreement with several studies showing that Hsp70 is one of the most important heat shock proteins for maintenance of cell integrity during normal cellular growth as well as under pathophysiological conditions.^{36,37} These data suggest that Hsp70 is important for maintaining structural, ultrastructural, and functional properties of skeletal muscle. Possibly, Hsp70-1A/B plays also an important role in structural modifications during post-mortem aging. Hsp70-1A/B has further an antiapoptotic role in skeletal muscle. Gao et al.³⁶ reported a function of Hsp70-1A/B in regulating TNF- α -induced cell apoptosis. By forming the complex Hsp70/CHIP/ASK1, Hsp70 promotes ASK1 proteasomal degradation and prevents TNF- α -induced cell apoptosis. Hsp70 proteins are also known to sequester pro-apoptotic factors such as BCL-2.³⁸ These data are in agreement with the important role of apoptosis in meat aging.^{7,39}

The present study found that in contrast to Hsp70-1A/B, the association between the relative abundance of the other Hsp70s and tenderness traits differed according to breed and muscle. This may be explained by different regulation of the expression of these Hsp70s in the muscle. In the present study, Hsp70/Grp75 and Hsp70-8 were less abundant in AA than in BA, particularly in the LT muscle. However, Hsp70-1A/B abundance did not differ between breeds in the two muscles. These data are in agreement with the results of Guillemain et al.,²⁷ who showed no effect of gender on Hsp70-1A/B abundance between steers and young bulls. This would explain the association between Hsp70-1A/B and tenderness across muscles and breeds observed in the present study. The lack of consistent associations between tenderness and Hsp70/Grp75 may be explained by the fact that it is exclusively expressed in

the mitochondrial matrix and that it is involved in the translocation and folding of nascent polypeptide chains of both nuclear and mitochondrial origin.⁴⁰

These findings suggest that Hsp70-1A/B could be a relatively general biomarker of tenderness in different muscles and breeds compared to proteins discussed earlier, which appear to be quite strongly muscle- or breed-specific.

In conclusion, this study shows that some biomarkers of tenderness such as MyHC IIx, LDH-B, and small Hsp are dependent on the contractile and metabolic properties of the muscle (cf. Figure 3), explaining their opposite relationships with tenderness in the ST compared to the LT muscle and in AA compared to LI and BA bulls. It further shows that Hsp70-1A/B is a biomarker of low beef tenderness across the breeds and muscles studied. All of these biomarkers need further testing in various muscles from cattle of different genders and breeds before they can be used as biomarkers in routine immunological testing.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*(B.P.) Phone: 0033473624056. Fax: 0033473624639. E-mail: brigitte.picard@clermont.inra.fr.

Funding

This work was part of the EU FP6 Integrated Project ProSafeBeef, contract no. FOODCT-2006-36241. Funding by the European Union is gratefully acknowledged with respect to animal production and laboratory analyses. We are further thankful to Constantine 1 University, INATAA Institute (Algeria), for the financial support given to M.G.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank INRA-Le Magneraud for the sensory analysis and INRA UERT (Theix) for animal management and slaughter. We thank all of the persons involved in this project for their assistance in data collection, the management and slaughtering of animals, muscle sampling, and the dot-blot and Warner–Bratzler assays.

REFERENCES

- (1) Verbeke, W.; Van Wezemael, L.; de Barcellos, M. D.; Kugler, J. O.; Hocquette, J. F.; Ueland, O.; Grunert, K. G. European beef consumers' interest in a beef eating-quality guarantee Insights from a qualitative study in four EU countries. *Appetite* **2010**, *54*, 289–296.
- (2) Picard, B.; Jurie, C.; Bauchart, D.; Dransfield, E.; Ouali, A.; Martin, J. F.; Jailler, R.; Lepetit, J.; Culioli, J. Muscle and meat characteristics from the main beef breeds of the Massif Central. *Sci. Aliments* **2007**, *27*, 168–180.
- (3) Renand, G.; Picard, B.; Touraille, C.; Berge, P.; Lepetit, J. Relationships between muscle characteristics and meat quality traits of young Charolais bulls. *Meat Sci.* **2001**, *59*, 49–60.
- (4) Chriki, S.; Renand, G.; Picard, B.; Micol, D.; Journaux, L.; Hocquette, J. F. Meta-analysis of the relationships between beef tenderness and muscle characteristics. *Livest. Sci.* **2013**, *155*, 424–434.
- (5) Hocquette, J. F.; Lehnert, S.; Barendse, W.; Cassar-Malek, I.; Picard, B. Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. *Animal* **2007**, *1*, 159–173.
- (6) Picard, B.; Berri, C.; Lefaucheur, L.; Molette, C.; Sayd, T.; Terlouw, C. Skeletal muscle proteomics in livestock production. *Brief Funct. Genomics* **2010**, *9*, 259–78.
- (7) Ouali, A.; Gagaoua, M.; Boudida, Y.; Becila, S.; Boudjellal, A.; Herrera-Mendez, C. H.; Sentandreu, M. A. Biomarkers of meat

tenderness: present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanisms involved. *Meat Sci.* **2013**, *95*, 854–870.

- (8) Picard, B.; Gagaoua, M.; Kammoun, M.; Terlouw, C.; Hocquette, J. F.; Micol, D. Biomarkers of beef tenderness in young bulls of three breeds. In *Proceedings of the 59th International Congress of Meat Science and Technology*, Izmir, Turkey; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2013; p 4.

- (9) Gagaoua, M.; Boudida, Y.; Becila, S.; Picard, B.; Boudjellal, A.; Herrera-Mendez, C. H.; Sentandreu, M.; Ouali, A. Serine protease inhibitors as good predictors of meat tenderness: which are they and what are their functions? *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2014**, DOI: 10.1080/10408398.2012.741630 .

- (10) Picard, B.; Lefevre, F.; Lebret, B. Meat and fish flesh quality improvement with proteomic applications. *Anim. Front.* **2012**, *2*, 18–25.

- (11) Picard, B.; Meunier, B.; Barboiron, C.; Dunoyer, N.; Guillemain, N.; Micol, D., From protein markers to phenotyping tools for evaluation of beef tenderness. In *Farm Animal Proteomics*; Rodrigues, P., Eckersall, D., Almeida, A., Eds.; Wageningen Academic Publishers: Wageningen, The Netherlands, 2012; pp 165–168.

- (12) Guillemain, N.; Bonnet, M.; Jurie, C.; Picard, B. Functional analysis of beef tenderness. *J. Proteomics* **2011**, *75*, 352–365.

- (13) Listrat, A.; Picard, B.; Jailler, R.; Collignon, H.; Peccatte, J. R.; Micol, D.; Geay, Y.; Dozias, D. Grass valorisation and muscular characteristics of blonde d'Aquitaine steers. *Anim. Res.* **2001**, *50*, 105–118.

- (14) Jurie, C.; Picard, B.; Micol, D.; Listrat, A.; Kammoun, M.; Hocquette, J. F. Muscle characteristics from young bulls of different beef breeds. In *57th International Congress of Meat Science and Technology*, Ghent, Belgium, Aug 7–12, 2011; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2011.

- (15) Guillemain, N.; Meunier, B.; Jurie, C.; Cassar-Malek, I.; Hocquette, J. F.; Levéziel, H.; Picard, B. Validation of a dot-blot quantitative technique for large-scale analysis of beef tenderness biomarkers. *J. Physiol. Pharmacol.* **2009**, *60*, 91–97.

- (16) Dubost, A.; Micol, D.; Picard, B.; Lethias, C.; Andueza, D.; Bauchart, D.; Listrat, A. Structural and biochemical characteristics of bovine intramuscular connective tissue and beef quality. *Meat Sci.* **2013**, *95*, 555–561.

- (17) Gagaoua, M.; Micol, D.; Richardson, R. I.; Hocquette, J. F.; Terlouw, E. M. C.; Meteau, K.; Juin, H.; Moloney, A. P.; Nuernberg, K.; Scollan, N. D.; Boudjellal, A.; Picard, B. Relationships between overall liking score and sensory meat attributes in different types of beef cattle. In *Proceedings of the 59th International Congress of Meat Science and Technology*, Izmir, Turkey; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2013; pp 1–4.

- (18) Lepetit, J.; Culioli, J. Mechanical properties of meat. *Meat Sci.* **1994**, *36*, 203–237.

- (19) Chaze, T.; Hocquette, J.-F.; Meunier, B.; Renand, G.; Jurie, C.; Chambon, C.; Journaux, L.; Rousset, S.; Denoyelle, C.; Lepetit, J.; Picard, B. Biological markers for meat tenderness of the three main French beef breeds using 2-DE and MS approach. In *Proteomics in Foods*; Toldrá, F., Nollet, L. M. L., Eds.; Springer: New York, 2013; Vol. 2, pp 127–146.

- (20) Allais, S.; Levéziel, H.; Hocquette, J.; Rousset, S.; Denoyelle, C.; Journaux, L.; Renand, G. Fine mapping of quantitative trait loci underlying sensory meat quality traits in three French beef cattle breeds. *J. Anim. Sci.* **2014**, DOI: 10.2527/jas.2014-7868.

- (21) Guillemain, N.; Meunier, B.; Jurie, C.; Cassar-Malek, I.; Hocquette, J. F.; Leveziel, H.; Picard, B. Validation of a dot-blot quantitative technique for large scale analysis of beef tenderness biomarkers. *J. Physiol. Pharmacol.* **2009**, *60* (Suppl. 3), 91–97.

- (22) Bouley, J.; Chambon, C.; Picard, B. Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* **2004**, *4*, 1811–1824.

- (23) Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.

- (24) Morzel, M.; Terlouw, C.; Chambon, C.; Micol, D.; Picard, B. Muscle proteome and meat eating qualities of Longissimus thoracis of “Blonde d’Aquitaine” young bulls: a central role of HSP27 isoforms. *Meat Sci.* **2008**, *78*, 297–304.
- (25) D’Alessandro, A.; Marrocco, C.; Rinalducci, S.; Mirasole, C.; Failla, S.; Zolla, L. Chianina beef tenderness investigated through integrated omics. *J. Proteomics* **2012**, *75*, 4381–4398.
- (26) Guillemain, N.; Jurie, C.; Renand, G.; Hocquette, J. F.; Micol, D.; Lepetit, J.; Picard, B. Different phenotypic and proteomic markers explain variability of beef tenderness across muscles. *Int. J. Biol.* **2012**, *4*, 26–38.
- (27) Guillemain, N.; Jurie, C.; Cassar-Malek, I.; Hocquette, J. F.; Renand, G.; Picard, B. Variations in the abundance of 24 protein biomarkers of beef tenderness according to muscle and animal type. *Animal* **2011**, *5*, 885–894.
- (28) Jia, X.; Veiseth-Kent, E.; Grove, H.; Kuziora, P.; Aass, L.; Hildrum, K. L.; Hollung, K. Peroxiredoxin-6 – a potential protein marker for meat tenderness in bovine longissimus thoracis muscle. *J. Anim. Sci.* **2009**, *87*, 2391–2399.
- (29) Manevich, Y.; Fisher, A. B. Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospholipid metabolism. *Free Radical Biol. Med.* **2005**, *38*, 1422–1432.
- (30) Morzel, M.; Gatellier, P.; Sayd, T.; Renner, M.; Laville, E. Chemical oxidation decreases proteolytic susceptibility of skeletal muscle myofibrillar proteins. *Meat Sci.* **2006**, *73*, 536–543.
- (31) Ouali, A.; Herrera-Mendez, C. H.; Coulis, G.; Becila, S.; Boudjellal, A.; Aubry, L.; Sentandreu, M. A. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Sci.* **2006**, *74*, 44–58.
- (32) Daugaard, M.; Rohde, M.; Jaattela, M. The heat shock protein 70 family: highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 3702–3710.
- (33) Sugimoto, M.; Furuoka, H.; Sugimoto, Y. Deletion of one of the duplicated Hsp-0 genes causes hereditary myopathy of diaphragmatic muscles in Holstein-Friesian cattle. *Anim. Genet.* **2003**, *34*, 191–197.
- (34) Crawford, G. L.; Horowitz, R. Scaffolds and chaperones in myofibril assembly: putting the striations in striated muscle. *Biophys. Rev.* **2011**, *3*, 25–32.
- (35) Miyabara, E. H.; Nascimento, T. L.; Rodrigues, D. C.; Moriscot, A. S.; Davila, W. F.; AitMou, Y.; deTombe, P. P.; Mestral, R. Overexpression of inducible 70-kDa heat shock protein in mouse improves structural and functional recovery of skeletal muscles from atrophy. *Pfluegers Arch: Eur. J. Physiol.* **2012**, *463*, 733–741.
- (36) Gao, Y.; Han, C.; Huang, H.; Xin, Y.; Xu, Y.; Luo, L.; Yin, Z. Heat shock protein 70 together with its co-chaperone CHIP inhibits TNF- α induced apoptosis by promoting proteasomal degradation of apoptosis signal-regulating kinase1. *Apoptosis* **2010**, *15*, 822–833.
- (37) Kundrat, L.; Regan, L. Identification of residues on Hsp70 and Hsp90 ubiquitinated by the cochaperone CHIP. *J. Mol. Biol.* **2010**, *395*, 587–594.
- (38) Beere, H. M.; Green, D. R. Stress management – heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. *Trends Cell Biol.* **2001**, *11*, 6–10.
- (39) Gagaoua, M.; Boudida, Y.; Becila, S.; Picard, B.; Boudjellal, A.; Sentandreu, M. A.; Ouali, A. New caspases’ inhibitors belonging to the serpin superfamily: a novel key control point of apoptosis in mammalian tissues. *Adv. Biosci. Biotechnol.* **2012**, *3*, 740–750.
- (40) Arakawa, A.; Handa, N.; Shirouzu, M.; Yokoyama, S. Biochemical and structural studies on the high affinity of Hsp70 for ADP. *Protein Sci.* **2011**, *20*, 1367–1379.

Supplément publication n°03

Supplément publication n° 03

Biomarkers of beef tenderness in young bulls of three breeds

B. Picard, **M. Gagaoua**, M. Kammoun, E.M.C. Terlouw, J.F. Hocquette, D. Micol,

Publié dans proceeding of 59th ICoMST 2013, Izmir-Turquie (ISBN: 978-605-125-720-4)

Résumé :

La filière bovine est aujourd'hui à la recherche d'un outil permettant de prédire précocement la tendreté de la viande. Cet outil qui doit être bien caractérisé et robuste, permettra de manager la variabilité non maîtrisée de la tendreté qui induit l'insatisfaction des consommateurs. L'objectif de cette étude est de mettre en évidence les relations existantes entre la tendreté et l'abondance de 21 protéines précédemment identifiées comme des biomarqueurs potentiels de la tendreté de la viande. Pour cela, un effectif de 71 jeunes taurillons de trois races, (Aberdeen Angus, Blonde d'Aquitaine et Limousine) ayant un âge moyen de 17 mois ont été utilisés. Les protéines ont été quantifiées par la technique de Dot-Blot sur les muscles *Longissimus thoracis* (entrecôte) et *Semitendinosus* (rond de gîte), en utilisant des anticorps spécifiques. Les résultats révèlent une relation négative entre la tendreté et certaines protéines associées aux fibres glycolytiques rapides dans le muscle *Longissimus thoracis*. De plus, nos résultats confirment que les protéines protectrices contre le stress oxydatif telles que les protéines de stress (Hsp) et Prdx6 sont associées à la tendreté. Par contre, la direction des relations est race-dépendante. Les résultats sont cohérents avec l'hypothèse que la tendreté soit liée au rapport petite Hsp/large Hsp70s. Les équations de régression expliquant la variabilité de la tendreté sont spécifiques pour chaque race et aussi à la température de cuisson de la viande évaluée.

Mots clés : Viande ; biomarqueurs ; tendreté ; qualité sensorielle ; taurillons ; prédiction.

BIOMARKERS OF BEEF TENDERNESS IN YOUNG BULLS OF THREE BREEDS

B. Picard¹, M. Gagaoua^{1,2}, M. Kammoun¹, C. Terlouw¹, J.F. Hocquette¹ and D. Micol¹

¹INRA, VetAgro Sup, UMR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

²INATAA, Constantine 1 University, Route de Ain El-Bey, 25000, Algeria

Abstract –The aim of this study was to validate the relationships between tenderness and the abundance of 21 proteins previously identified as potential biomarkers of beef tenderness in several genomic experiments. Seventy 17-month-old young bulls of three breeds, Angus (AA), Blond d'Aquitaine (BA) and Limousin (LIM) were used. Proteins were quantified by dot-blot with specific antibodies. The results confirm a negative relationship between tenderness and proteins associated with fast glycolytic fibres in *Longissimus thoracis* muscle. They confirm that proteins protecting against oxidative stress such as PRDX6 and Heat shock proteins (Hsp) are associated with tenderness but the direction of the correlation is breed dependent. Results are coherent with the hypothesis that tenderness is related to the ratio “small Hsp's/Hsp70s”. Regression equations predicting tenderness were specific for breed and cooking temperature.

Key Words – meat, sensory quality, cattle, proteins.

I. INTRODUCTION

For the beef sector, it is of major interest to be able to predict for consumers tenderness of the meat of live animals, carcass or cuts, as variability in beef tenderness causes dissatisfaction of consumers. For several years, various scientific programs aimed to identify genomic biomarkers for tenderness [1]. Transcriptomic and proteomic analysis on bovine muscles with low or high tenderness assessed by sensory analysis and/or mechanical measurements allowed us to produce a list of several protein tenderness biomarkers [2]. The present study investigated in more detail the relationships between the abundance of these proteins and tenderness in young bulls of three breeds differing in their earliness, as part of the EU [ProSafeBeef](#) project.

II. MATERIALS AND METHODS

The study used 70 young bulls: Aberdeen Angus (AA; n =20), Blond d'Aquitaine (BA; n =25) and

Limousin (LIM; n =25). AA are known as fatty, BA for their high muscle and low intramuscular fat content and LIM have intermediate properties. The young bulls (12-month-old) were assigned to a 100 day finishing period. They were housed in straw pens. Diets consisted of concentrate (75%) and straw (25%). Animals were slaughtered at about 17 months of age at a live weight around 665 kg. They were slaughtered at the experimental abattoir of the INRA Research centre in compliance with the current ethical guidelines for animal welfare. The experience was carried out in two replicates (2 consecutive years, during the spring/summer seasons) using a balanced experimental design. *Longissimus thoracis* (LT, mixed fast oxido-glycolytic muscle) samples were excised from the 6th rib 15 minutes after slaughter, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. Total protein extractions were performed according to Bouley *et al.* [3]. The abundance of the 21 proteins was quantified by dot-blot analysis according to the protocol described by Guillemain *et al* [4] using specific antibodies previously validated by western-blot. Protein abundance for each sample, given in arbitrary units, was normalised using a mix of different samples being the reference. The proteins studied represented 5 different biological functions: (i) muscle fibre structure with CapZ- β , α -actin, Myosin Light Chain (MyLC-1F), Myosin Binding Protein (MyBP-H), Myosin Heavy Chain (MyHC) IIX and II (IIa+IIX); (ii) muscle metabolism with Enolase (Eno3), Lactate dehydrogenase (LDH), and Malate Dehydrogenase (MDH1); (iii) proteolysis with μ -calpain; (iv) oxidative resistance with DJ-1, Peroxiredoxin (PRDX6), and (v) Heat shock proteins (Hsp) with Hsp20, 27, $\alpha\beta$ -crystallin, Hsp40, Hsp70-1B, Hsp70-8, Hsp70/GRP75 [4]. Tenderness of LT steaks aged for 14 days was assessed by sensory analysis with a trained panel as described by Dransfield *et al.*, [5]. Two grilled cooking temperatures were used: 55 and 74 °C.

Variance analysis (ANOVA) was used to compare breeds. The relationship between protein abundance and tenderness was evaluated by principal components analysis (PCA) and across breeds and per breed by multiple regression selecting parameters amongst protein abundance, breed (where applicable) and replicate to produce best models in terms of variability explained. XISTAT 2009 and SAS 9.2 software's were used.

III. RESULTS AND DISCUSSION

The PCA on the abundance of 19 most relevant proteins and tenderness scores for the three breeds is illustrated in Figure 1.

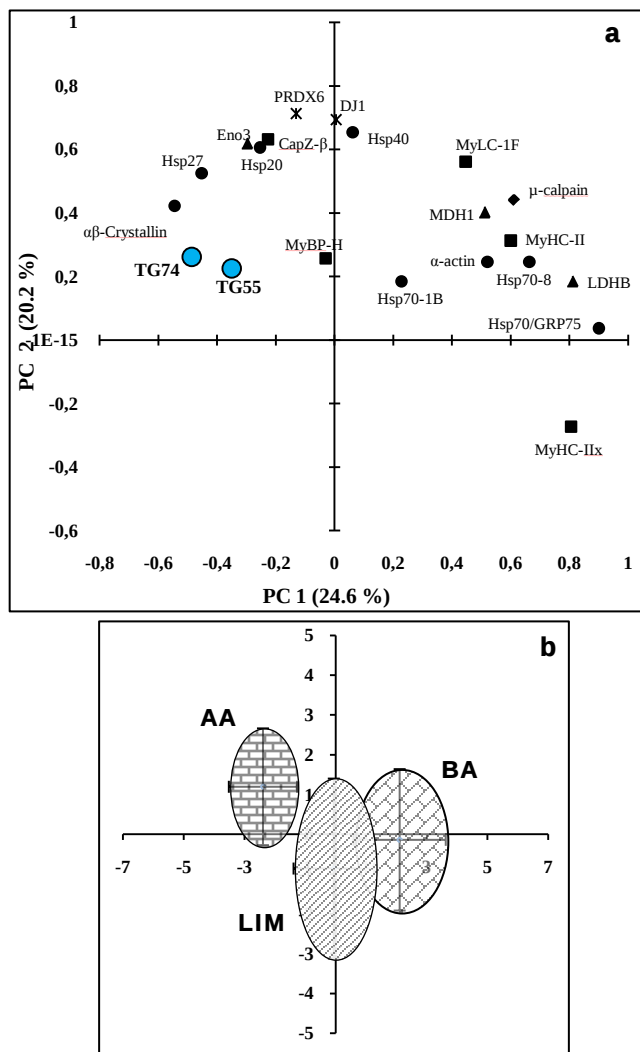


Figure 1. Principal component analysis. a) Distribution of protein abundance and tenderness scores; b) Distribution of the three breeds on the first two principal axes (mean $\pm$ standard errors).

The PCA shows that when considered across breeds, high tenderness scores whether obtained at 55 or 74°C were associated with small Hsp proteins (Hsp27, Hsp20, α -crystallin), Enolase 3, structural protein CapZ- β and antioxidants PRDX6 and DJ1. Low tenderness was associated with proteins of the Hsp70 family (Hsp70-8, Hsp70-1B and Hsp70/GRP75), or related to fast glycolytic muscle fibres (e.g. LDHB, fast MyHC). These data are coherent with the results of previous experiments on the LT muscle of young bulls, which found positive relationships between tenderness and slow oxidative; and negative relationships with fast glycolytic properties [6]. Our results are also in agreement with Guillemin *et al.* [7] who suggested that small Hsp are tenderness, and Hsp70s toughness markers. The authors hypothesized that tenderness depends on the Hsp20s/Hsp70s ratio which is coherent with our results. Proteins involved in oxidative stress such as DJ-1 and PRDX6 were also earlier found to be associated with tenderness (for review see Picard *et al.* [1]).

Multiple regression analyses across breeds (Table 1) found models with relatively weak predictive power for tenderness obtained at 55°C and 74°C. The three most explicative proteins were MyHC IIx, Hsp 20 and Hsp70-1B at 55°C and PRDX6, Hsp70/GRP75, and Hsp70-1B at 74°C.

The equations of prediction of tenderness established for each given breed were tested on the two other breeds. In none of the cases the models were significant, indicating that each model was specific for each breed (data not shown). This is in accordance with the observation that the direction of the correlations between tenderness and certain proteins depended on the breed. For example, MyHC-IIx was positively correlated with tenderness in Angus but negatively in the across-breed model (Table 1). Negative correlations between MyHC-IIx and tenderness were earlier observed in young bulls of French beef breeds including BA, LIM or Charolais [6, 8], but not in the Angus breed. The relationships found may depend on the contractile and metabolic properties of the muscle [9].

Table 1. Equations of best models (parameters including the direction and level of significance) to predict tenderness across breeds and for each breed

	Parameter 1	P-value ¹	Parameter 2	P-value	Parameter 3	P-value	Predictive power ²	P-value model
Cooking temperature 74°C								
All breeds	+ PRDX6	**	– Hsp70/GRP75	+	– Hsp70-1B	**	27	<.0001
AA	– ENO3	***	+ MyBPH	***	+ Hsp27	**	79	<.0001
BA	+ αβ-crystallin	+	+ α-actine	*	/	/	32	0.005
LIM	+ PRDX6	+	– Hsp70-1B	*	/	/	30	0.008
Cooking temperature 55°C								
All breeds	– MyHC-IIx	+	+ Hsp20	+	– Hsp70 1B	+	17	0.002
AA	– MyLC-1F	**	+ MyHC-IIx	+	Replicate	±	35	0.02
BA	+ DJ1	***	– MyBPH	+	Replicate	*	40	0.003
LIM	– Hsp70-1B	*	+ MyLC-F1	*	/	/	35	0.003

¹. P-value: significance of differences, ***: $P < 0.0001$; **: $P < 0.001$; *: $P < 0.01$; +: $P < 0.05$; ± : $P = 0.06$

². % of variability between animals explained by the model.

Table 2. Breed effects on tenderness

Cooking temp.	Tenderness score (1-10)			SEM	P-value
	AA	BA	LIM		
55 °C	5.27 a	4.85 b	4.75 b	0.08	0.04
74 °C	4.82 a	4.05 b	4.16 b	0.08	0.0003

On a same line, different superscripts indicate significant differences ($P < 0.05$).

Multiple regression analysis carried out for each breed separately revealed different prediction equations of tenderness (Table 1; Figure. 2). Moreover, ANOVA analysis found that Angus produced more tender meat (Table 2).

Our earlier results showed that the LT muscle of Angus young bulls is more slow oxidative and has a higher intramuscular fat content compared to LIM and BA [10]. Present results may indicate that within breeds with muscles presenting slow oxidative properties, animals with fewer oxidative fibres were more tender. In breeds having muscles presenting fast glycolytic properties, animals with relatively high proportions of oxidative fibres were more tender. This hypothesis was already proposed by Morzel *et al.* [11] for BA young bulls. We observed the same differences for the Hsp from the small Hsp family. Guillemin *et al.* [9] showed that the abundance of small Hsp depended on the type of muscle and of animal.

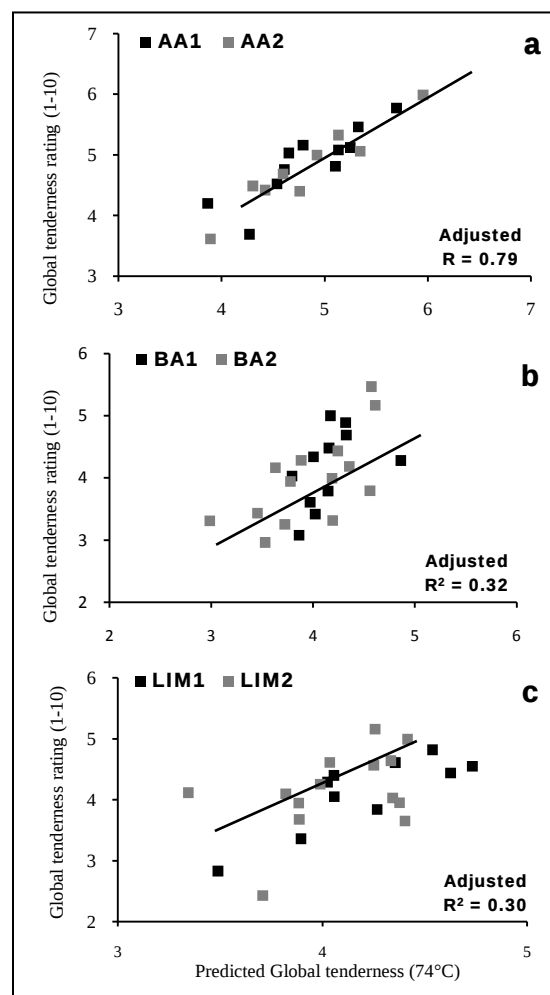


Figure 2. Correlation between predicted and measured tenderness of meat cooked at 74°C for the AA (a), BA (b) and LIM breed (c).

Variations in results found in the literature may thus be explained by the existence of different mechanisms according to muscle properties.

Our results are also coherent with earlier suggestions that proteins associated with oxidative stress are related to tenderness in cattle [1] and pigs [12]. The underlying cellular mechanism may involve Hsp, which protect structural proteins against oxidative stress and proteolysis, known to be involved in the tenderisation process. However, the relationship between antioxidative proteins such as PRDX6 and tenderness deserves further investigation as its association with tenderness is positive in some experiments as in the present study, and negative in others (for review see Picard *et al* [1]). The present results demonstrate that to understand the mechanisms underlying tenderness, it is necessary to establish prediction equations of tenderness for each type of animal separately.

IV. CONCLUSION

The present results indicate that several proteins are involved in the determinism of tenderness, but that the proteins and the underlying mechanisms depend on breed characteristics and on cooking temperature. The antibodies corresponding to the proteins validated as tenderness biomarkers will be used to develop an antibody micro-array as a new practical tool for the evaluation of tenderness.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the European ProSafeBeef project (6th PCRD) for funding. They thank Nicole Dunoyer for the dot-blot analysis and Christiane Barboiron for protein extractions, Catherine Jurie for her contribution to a part of the statistical analysis. They thank the Inra experimental Unit for management and slaughter of animal and muscle sampling. Finally, they thank Karine Méteau Inra Le Magneraud, for sensory analysis.

REFERENCES

1. Picard, B., Lefèvre F., Lebret, B. (2012). Meat and fish quality improvement with proteomic applications. *Animal Frontiers* 2: 18-25.
2. Guillemain, N., Bonnet, M., Jurie, C., Picard, B., (2011a). Functional analysis of beef tenderness. *Journal of Proteomics*, 75(2): 352-365.
3. Bouley, J., Chambon, C., Picard, B., (2004). Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 4 (6): 1811-1824.
4. Guillemain, N., Meunier, B., Jurie, C., Cassar-Malek, I., Hocquette, JF, Levéziel, H and Picard, B (2009). Validation of a Dot-Blot quantitative technique for large-scale analysis of beef tenderness biomarkers. *Journal of Physiology and Pharmacology* 60: 91-97.
5. Dransfield, E., Martin, J.-F., Bauchart, D., Abouelkaram, S., Lepetit, J., Culioli, J., Jurie, C., & Picard, B. (2003). Meat quality and composition of three muscles from French cull cows and young bulls. *Animal Science* 76 : 387-399.
6. Chaze, T., Hocquette, J.F., Meunier, B. , Renand, G., Jurie, C., Chambon, C., Journaux, L., Rousset, S., Denoyelle, C., Lepetit, J., Picard, B. (2013). Biological Markers for Meat Tenderness of the Three Main French Beef Breeds Using 2-DE and MS Approach. In: *Proteomics in Foods*. Edited by Toldrá F, Nolle LML, vol. 2: Springer US; 2013: 127-146.
7. Guillemain, N., Jurie, C., Renand, G., Hocquette, J. F., Micol, D., Lepetit, J., & Picard, B. (2012). Different phenotypic and proteomic markers explain variability of beef tenderness across muscles. *International Journal of Biology* 4: 26-38.
8. Chriki, S., Gardner, G. E., Jurie, C., Picard, B., Micol, D., Brun, J. P., Journaux, L., & Hocquette, J. F., 2012. Cluster analysis application in search of muscle biochemical determinants for beef tenderness. *BMC Biochemistry*: 13, 29.
9. Guillemain N., Jurie C., Cassar-Malek I., Hocquette J.-F., Renand G., Picard B., (2011b). Variations in the abundance of 24 protein biomarkers of beef tenderness according to muscle and animal type. *Animal* 5, 885-894.
10. Jurie C., Picard B., Micol D., Listrat A., Kammoun M., Hocquette J.F. Muscle characteristics from young bulls of different beef breeds. 57th International Congress of Meat Science and Technology, August 7th – 12th 2011, Ghent - Belgium.
11. Morzel, M, Terlouw, C, Chambon, C, Micol, D and Picard, B 2008. Muscle proteome and meat eating qualities of Longissimus thoracis of "Blonde d'Aquitaine" young bulls: A central role of HSP27 isoforms. *Meat Science* 78: 297-304.
12. Jia, X., Veiseth-Kent, E., Grove, H., Kuziora, P., Aass, L., Hildrum, K. I. and Hollung, K., 2009. Peroxiredoxin-6 - a potential protein marker for meat tenderness in bovine m. Longissimus thoracis muscle. *Journal of Animal Sciences*: 2391-2399.

Biomarqueurs du pH et de la couleur de la viande

Introduction

La couleur est un critère de qualité important pour la viande et influence fortement les décisions des consommateurs à l'achat (Mancini et Hunt, 2005; Mancini 2009). La couleur est influencée par la teneur et l'état physico-chimique de la myoglobine et aussi par l'aspect structural de la viande (Renner et al., 1992; Abril et al., 2001). L'aspect structural du muscle est lié au pH ultime : à un pH ultime élevé, les fibres musculaires sont très liées entre elles à cause de la forte capacité de rétention d'eau, et comme résultat, la surface du muscle qui absorbe peu de lumière réfléchiée et la viande apparaît plus sombre (Renner et al., 1992; Abril et al., 2001). La vitesse de chute du pH après la mort de l'animal, influence aussi les réactions biochimiques mises en œuvre, ainsi que les caractéristiques structurales des muscles et par conséquent, la couleur de la viande (Lindahl et al., 2006; Boudjellal et al., 2008).

La myoglobine (Mb) joue un rôle central dans la couleur de la viande. La teneur en Mb, dépend du type de muscle et d'autres facteurs tels que la race, l'âge et l'alimentation (Mancini et Hunt, 2005; Mancini 2009). Les fibres musculaires oxydatives à contraction lentes sont riches en Mb par rapport aux fibres glycolytiques à contraction rapide (Renner et al., 1992). La Mb contient un atome de fer central appelé hème et qui est formé d'un noyau tétrapyrrolique. Le noyau ferrique de la Mb peut être réduit (DeoxyMb; rose), oxygéné (MbO₂; rouge vif) ou oxydé (MetMb; brun) (Suman et Joseph, 2013). L'inter-conversion des trois formes dans une viande fraîche dépend des teneurs en anti- et pro-oxydants présents (Joseph et al., 2015). La perte de l'activité réductrice de la viande au cours du stockage est la résultante d'une combinaison de facteurs, tels que la baisse du pH, l'épuisement des substrats nécessaires et cofacteurs comme le NADH⁺, la présence de produits secondaires de la peroxydation, la dénaturation d'enzymes induite par le pH et enfin la désintégration structurale et les pertes des propriétés fonctionnelles de la mitochondrie (Faustman et al., 1999; Mancini et Hunt, 2005; Joseph et al., 2015).

Les études comparatives de transcriptomique et protéomique ont révélé différentes voies biochimiques impliquées dans la mise en place des qualités sensorielles de la viande, telles la tendreté, la jutosité et la capacité de rétention d'eau (Kwasiborski et al., 2008; Bjarnadottir et al., 2010; Ouali et al., 2013; Picard et al., 2015). Ces voies métaboliques englobent des protéines de structure, de protéolyse, du stress, de résistance au stress oxydant, de l'apoptose ou du métabolisme énergétique (Guillemin et al., 2009; Ouali et al., 2013; Picard et al., 2014). Nous supposons, que certaines de ces voies sont également impliquées dans le développement de la couleur de la viande et sa stabilité. En particulier, les protéines liées aux processus d'oxydation, donc le potentiel redox du muscle, ou du métabolisme énergétique, et par conséquent la situation des réserves en NADH⁺ et la vitesse de chute du pH, et au phénomène d'apoptose (Sayd et al., 2006; Joseph et al., 2012; Desai et al., 2014; Canto et al., 2015).

Les recherches en protéomique ont permis à notre groupe d'établir une liste de protéines, appelés biomarqueurs, potentiellement prédictifs de nombreuses qualités sensorielles (Picard et al., 2015). Par ailleurs, les investigations conduites par d'autres groupes sur la biochimie de la couleur de la viande et les protéines potentiellement explicatives ont été effectuées 24 h ou plus après abattage. Dans la présente étude, nous avons utilisé des biomarqueurs identifiés précédemment pour la tendreté (Guillemin et al., 2009 ; 2011 ; Picard et al., 2014) afin d'évaluer les relations entre l'abondance de ces protéines 45min après l'abattage, et les paramètres de chute du pH ainsi que les coordonnées $L^* a^* b^*$ de la couleur de la viande. Pour atteindre ces objectifs, la technique immunologique du Dot-Blot a été utilisée comme un outil à haut débit. Nos investigations ont eu lieu sur le muscle *Longissimus thoracis* de 21 jeunes taurillons de la race Blonde d'Aquitaine, une race à viande tendre et à fort développement musculaire qui se caractérise par une couleur relativement pâle.

Understanding early *post-mortem* biochemical processes underlying meat color and pH decline in the *Longissimus thoracis* muscle of young Blond d'Aquitaine bulls using protein biomarkers

M. Gagaoua, E.M.C. Terlouw, D. Micol, A. Boudjellal, J.F. Hocquette, B. Picard

Publié dans *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2015) **63** (30), 6799 - 6809

Résumé :

Les études protéomiques antérieures conduites sur la stabilité de la couleur de la viande et les mécanismes impliquant des protéines représentatives de différentes voies métaboliques ont été réalisées après 24h *post-mortem* ou au-delà. La présente étude réalisée sur le muscle *Longissimus thoracis* de 21 jeunes taurillons de la race Blonde d'Aquitaine prélevé 1 heure après abattage, vise à évaluer les relations entre une liste de biomarqueurs protéiques, initialement validée pour la tendreté, avec la chute du pH et les coordonnées $L^*a^*b^*$ de la couleur. Les valeurs du pH à 45 min, 3h et 30h *post-mortem* sont corrélées avec 3, 6 et 7 biomarqueurs, respectivement. Les coordonnées $L^*a^*b^*$ 24h après abattage, sont corrélées avec 9, 5 et 8 biomarqueurs, respectivement. Les modèles de prédiction retiennent souvent les protéines de stress (Hsp) et expliquent entre 47 et 59% de la variabilité du pH et entre 47 et 65% de la variabilité des coordonnées $L^*a^*b^*$. Les protéines corrélées avec les paramètres du pH et/ou de la couleur sont impliquées dans le phénomène de l'apoptose ou ont des activités anti-oxydantes et chaperonnes. Parmi les résultats robustes, la Prdx6 a été trouvée corrélée négativement avec le pH mesuré à 45min, 3h et 30h *post-mortem*, et qui s'expliquent par les activités anti-oxydantes et phospholipases de la Prdx6. De même, la Hsp70-1A/B et μ -calpaine sont interactivement corrélées avec les coordonnées $L^*a^*b^*$, en raison peut être de l'action protectrice de Hsp70-1A/B sur l'activité protéolytique de la μ -calpaine et par conséquent sur la dégradation des protéines de structure. D'autres corrélations ont été trouvées entre les enzymes glycolytiques, MDH1, ENO3 et LDH-B et la chute du pH ou la stabilité de la couleur. Cette relation est probablement due à l'implication de ces enzymes dans les voies de la glycolyse, et donc, l'état énergétique de la cellule. Les résultats de cette étude, montrent que les biomarqueurs peuvent être utilisés efficacement pour la prédiction ou la compréhension des mécanismes biologiques régissant la chute du pH et/ou le développement de la couleur de la viande bovine juste après abattage.

Mots clés : Bovin; Blonde d'Aquitaine ; viande ; couleur ; pH ; biomarqueurs ; *post-mortem* ; mécanismes biologiques.

Understanding Early Post-Mortem Biochemical Processes Underlying Meat Color and pH Decline in the *Longissimus thoracis* Muscle of Young Blond d'Aquitaine Bulls Using Protein Biomarkers

Mohammed Gagaoua,^{†,‡,§} E. M. Claudia Terlouw,^{†,‡} Didier Micol,^{†,‡} Abdelghani Boudjellal,[§] Jean-François Hocquette,^{†,‡} and Brigitte Picard^{*,†,‡}

[†]INRA, UMR 1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès Champanelle, France

[‡]Clermont Université, VetAgro Sup, UMR 1213 Herbivores, B.P. 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

[§]Equipe Maquav, INATAA, Université Frères Mentouri Constantine, Route de Ain El-Bey, 25000 Constantine, Algeria

ABSTRACT: Many studies on color biochemistry and protein biomarkers were undertaken in post-mortem beef muscles after ≥ 24 hours. The present study was conducted on *Longissimus thoracis* muscles of 21 Blond d'Aquitaine young bulls to evaluate the relationships between protein biomarkers present during the early post-mortem and known to be related to tenderness and pH decline and color development. pH values at 45 min, 3 h, and 30 h post-mortem were correlated with three, seven, and six biomarkers, respectively. $L^*a^*b^*$ color coordinates 24 h post-mortem were correlated with nine, five, and eight protein biomarkers, respectively. Regression models included Hsp proteins and explained between 47 and 59% of the variability between individuals in pH and between 47 and 65% of the variability in $L^*a^*b^*$ color coordinates. Proteins correlated with pH and/or color coordinates were involved in apoptosis or had antioxidative or chaperone activities. The main results include the negative correlations between $\text{pH}_{45 \text{ min}}$, $\text{pH}_{3 \text{ h}}$, and $\text{pH}_{30 \text{ h}}$ and Prdx6, which may be explained by the antioxidative and phospholipase activities of this biomarker. Similarly, inducible Hsp70-1A/B and μ -calpain were correlated with $L^*a^*b^*$ coordinates, due to the protective action of Hsp70-1A/B on the proteolytic activities of μ -calpain on structural proteins. Correlations existed further between MDH1, ENO3, and LDH-B and pH decline and color stability probably due to the involvement of these enzymes in the glycolytic pathway and, thus, the energy status of the cell. The present results show that research using protein indicators may increase the understanding of early post-mortem biological mechanisms involved in pH and beef color development.

KEYWORDS: beef, Blond d'Aquitaine, meat color, pH, protein biomarkers, post-mortem, biological mechanisms

INTRODUCTION

Meat color is an organoleptic characteristic with a major influence on purchase decisions by consumers.^{1,2} Color is influenced by the content and physicochemical state of myoglobin and by the meat structure.^{3,4} The latter is directly related to the ultimate pH: at high ultimate pH, muscle fibers are more tightly packed together as a result of increased water-holding capacity of muscle protein. As a consequence, its surface will scatter light less and the meat will appear darker.^{3,4} The rate of post-mortem pH decline influences biochemical reactions and structural characteristics of the muscles and may also influence color.^{5,6}

Myoglobin (Mb) plays further a central role in meat color. Mb content depends not only on the muscle but also on other factors such as breed, age, and diet.^{1,2} Slow-twitch oxidative muscle fibers are rich in Mb compared to fast-twitch glycolytic fibers.³ Mb contains a hemeatin nucleus with a central iron atom. The iron atom of Mb may be reduced (DeoxyMb; purple), oxygenized (MbO₂; bright red), or oxidized (MetMb; brown).⁷ The interconversion of the three forms in fresh beef depends on the levels of antioxidants and pro-oxidants present.⁸ Loss of reducing activity in meat during storage is due to a combination of factors including pH decline, depletion of required substrates and cofactors particularly NADH, the presence of secondary lipid oxidation products, pH-induced denaturation of the enzymes, and ultimately the complete loss of structural integrity and functional properties of the mitochondria.^{1,8,9}

Comparative transcriptomic and proteomic studies have revealed biochemical pathways involved in meat sensory qualities, including tenderness, juiciness, and water-holding capacity.^{10–13} These pathways are related to myofibril structure, proteolysis, heat stress, oxidative stress resistance, apoptosis, or energy metabolism.^{12,14,15} At least part of these pathways may also be related to meat color development and stability, particularly those related to oxidative processes and the redox status of the muscle, to energy metabolism, and consequently to the status of the NADH pool and pH decline, and to apoptosis.^{16–19}

Such transcriptomic and proteomic studies have allowed our laboratory to establish a list of proteins, known as biomarkers, potentially predictive of certain sensory qualities.¹³ Many studies on color biochemistry and protein biomarkers were undertaken in post-mortem beef muscles after ≥ 24 h post-mortem. The present study uses the earlier identified biomarkers to evaluate the relationships between protein status in the early post-mortem period, subsequent pH decline, and beef color as evaluated by $L^*a^*b^*$ coordinates. The study uses a high through-put technique and was conducted on young bulls of the French Blond

Received: May 26, 2015

Revised: July 9, 2015

Accepted: July 9, 2015

Published: July 9, 2015

d'Aquitaine (BA) breed, characterized by good muscle development, producing tender meat²⁰ but with a relatively pale color.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Sampling. This study was part of the European ProSafeBeef project (FOOD-CT-2006-36241). Twenty-one Blond d'Aquitaine (BA) young bulls reared under intensive conditions and finished over two consecutive years (two replicated groups) were used. At 12 months of age, they were subjected to a 105 day finishing period until slaughter. Diets consisted of concentrate (75%) and straw (25%). Before slaughter, all animals were food deprived for 24 h and had free access to water. The animals at a live weight of 635 ± 52 kg were slaughtered at the experimental abattoir of the INRA Research center in compliance with the current ethical guidelines for animal welfare. Bulls were directly transported (4.5 ± 0.1 min) in a lorry (3×2 m livestock compartment) from the experimental farm to the experimental abattoir situated 2 km from the rearing building, with two bulls of the same home pen per transport to avoid social isolation stress. After unloading, they were slaughtered within 3 min.²¹ The mean hot carcass weight was 410 ± 42 kg (range from 337 to 500 kg). The carcasses were not electrically stimulated, and they were chilled and stored at 4 °C from 1 h until 24 h post-mortem. *Longissimus thoracis* (LT, mixed fast oxidoglycolytic) muscle samples were excised from the left side of the sixth rib 30 min post-mortem and frozen in liquid nitrogen before storage at -80 °C until protein extractions for Dot-Blot analysis or myosin heavy chain (MyHC) quantification.

pH Measurements. For $pH_{45 \text{ min}}$ measurement, biopsies were made from the carcasses (10th rib), whereas $pH_{3 \text{ h}}$ and ultimate pH (30 h; pH_u) were measured directly on the carcass (right side). pH was determined as in Bourguet et al.²¹ Briefly, 2 g of each LT sample excised 45 min after slaughter was immediately homogenized in 18 mL of 5 mM sodium iodoacetate and stored at 4 °C. The pH of the homogenate was measured the following day at 6 °C. For $pH_{3 \text{ h}}$ and pH_u , the pH was recorded directly on the carcass between the sixth and seventh rib using a pH meter (Hanna Instruments, HI9025) equipped with a glass electrode suitable for meat penetration. For each time point, five measurements were made (positioned on a horizontal line with about 1.5 cm between two measurements).

Meat Color. The LT muscle was excised from the stored carcass at the level of the sixth rib *thoracis* vertebra 24 h post-mortem to determine color attributes. Instrumental meat color measurements were recorded for lightness (L^* = measures light reflected), redness (a^* = measures positive red and negative green), and yellowness (b^* = measures positive yellow and negative blue) directly on the tissue of the muscle using a Minolta CR-300 chromameter (Minolta Co., Ltd., Osaka, Japan), with a 0° viewing angle, C illuminant, and 8 mm measurement aperture. Fresh-cut slices of muscle of not less than 2.5 cm thick and overwrapped were left on a polystyrene tray to refrigerate at 1 °C for 1 h to allow blooming. Calibration was performed by using standard white tiles ($Y = 93.58$, $x = 0.3150$, and $y = 0.3217$) prior to color determination. Three replicate measurements were taken, and an average value was used for analysis. Color coordinates were expressed as L^* , a^* , b^* following the CIE- $L^*a^*b^*$ system.

Protein Extractions. Total protein extractions were performed to use subsequently the soluble fractions for Dot-Blot analysis according to the method of Bouley et al.²² Briefly, 80 mg of muscle was homogenized in a denaturation/extraction buffer containing 8.3 M urea, 2 M thiourea, 1% DTT, and 2% CHAPS. After 30 min of centrifugation at 10000g at 8 °C, the supernatant was stored at -20 °C until use. The protein concentrations of the extracts were determined according to the Bradford method²³ using the Bio-Rad protein assay. Bovine serum albumin (BSA) at a concentration of 1 mg/mL was used as standard.

Dot-Blot Analysis. The abundances of 18 proteins (including intact molecules and their fragments) corresponding to five different biological functions (Table 1), muscle fiber structure (actin, MyBP-H, CapZ- β , and MyLC-1F), metabolism (ENO3, LDHB, and MDH1), proteolysis (μ -calpain), oxidative resistance (DJ-1, Prdx6, and SOD1), and heat shock proteins (α B-crystallin, Hsp20, Hsp27, Hsp40, Hsp70-1A/B, Hsp70-8, and Hsp70-Grp75), were determined using the Dot-Blot

Table 1. Eighteen Protein Biomarkers Quantified Using the Dot-Blot Technique^a

protein biomarker name (<i>gene</i>) ^b	UniProtKB ID	monoclonal (Mo) or polyclonal (Po) antibody ref	antibody dilution
heat shock proteins			
α B-crystallin (CRYAB)	P02511	Mo anti-bovine Assay Designs SPA-222	1/500
Hsp20 (HSPB6)	O14558	Mo anti-human Santa Cruz HSP20-11:SCS1955	1/200
Hsp27 (HSPB1)	P04792	Mo anti-human Santa Cruz HSP27 (F-4):SC13132	1/3000
Hsp40 (DNAJA1)	P31689	Mo anti-human Santa Cruz HSP40-4 (SPM251):SC-56400	1/250
Hsp70-1A/B (HSPA1B)	P08107	Mo anti-human Abnova HSPA1B (M02), clone 3B7	1/2000
Hsp70-8 (HSPA8)	P11142	Mo anti-bovine Santa Cruz HSC70 (BRM22):SC-59572	1/250
Hsp70-Grp75 (HSPA9)	P38646	Mo anti-human RD Systems clone 419612	1/250
metabolism			
enolase 3 (ENO3)	P13929	Mo anti-human Abnova Eno3 (M01), clone SD1	1/45000
LDH-B (LDHB)	P07195	Mo anti-human Novus LDHB NB110-57160	1/50000
MDH1 (MDH1)	P40925	Mo anti-pig Rockland 100-601-145	1/1000
structure			
CapZ- β (CAPZB)	P47756	Mo anti-human Abnova CAPZB (M03), clone 4H8	1/250
α -actin (ACTA1)	P68133	Mo anti-rabbit Santa Cruz α -actin (SCS):SC-58670	1/1000
MyLC-1F (MYL1)	P05976	Po anti-human Abnova MYL1 (A01)	1/1000
MyBP-H (MYBPH)	Q13203	Mo anti-human Abnova MYBPH (M01), clone 1F11	1/4000
oxidative resistance			
DJ-1 (PARK7)	Q99497	Po anti-human Santa Cruz DJ-1 (FL-189):SC-32874	1/250
Prdx6 (PRDX6)	P30041	Mo anti-human Abnova PRDX6 (M01), clone 3A10-2A11	1/500
SOD1 (SOD1)	P00441	Po anti-rat Acris SOD1 APO3021PU-N	1/1000
proteolysis			
μ -calpain (CAPN1)	P07384	Mo anti-bovine Alexis μ -calpain 9A4H8D3	1/1000

^aThe suppliers and conditions for each primary antibody used in this study are given. ^bFor protein marker abbreviations see Table 2.

technique.^{14,15} Compared to Western blot, Dot-Blot is a fast technique, but with a similar coefficient of variation inter- and intra-assay (10%). Optimal dilution ratios of the antibodies were determined, using the conditions indicated by the supplier and adapted to bovine muscle samples (Table 1). For that, Western blots were used to check the specificity of all antibodies. An antibody was considered specific against the studied protein when only one band at the expected molecular weight was detected by Western blot. Western blots with all primary antibodies show that all of the antibodies used bound specifically to the bovine protein with the expected theoretical molecular weight.

Conditions retained and suppliers for all primary antibodies dilutions are summarized in Table 1. Protein extracts (15 μ g) of each of the 21 muscle samples were spotted (four replications per muscle sample) on a nitrocellulose membrane with the Minifold I Dot-Blot apparatus from Schleicher & Schuell Biosciences (Germany) in a random order on the 96-spots membrane. In addition, a mixed standard sample (15 μ g) was deposited for data normalization as reported by Guillemain et al.¹⁵ The Dot-Blot membrane was air-dried for 5 min, blocked in 10% milk blocking buffer at 37 °C for 20 min, and then hybridized and incubated with the specific primary antibody of each protein (Table 1). Infrared

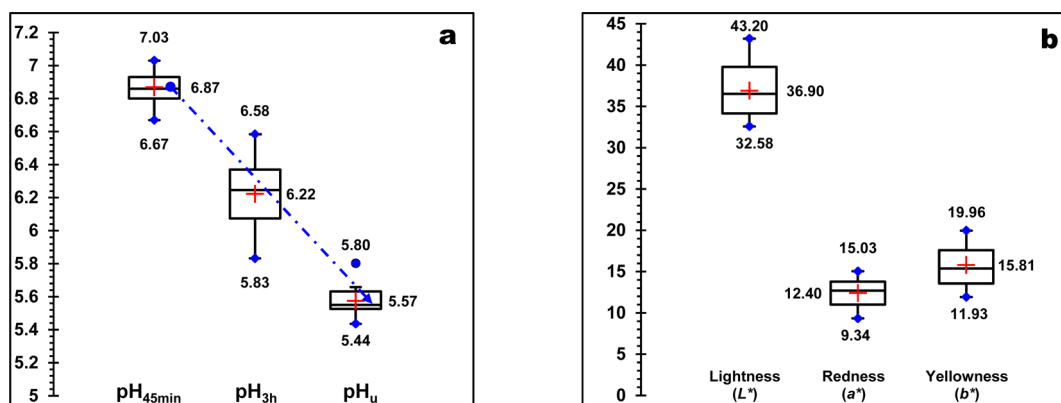


Figure 1. Average means of (a) pH (45 min, 3 h, and ultimate (u)) and (b) $L^*a^*b^*$ meat color parameters of *Longissimus thoracis* muscle of Blond d'Aquitaine young bulls ($n = 21$). The parameters are presented as box–whiskers plots: for each variable independently, the central point represents the average value calculated over all of the observations. The box represents the average value $\pm$ one standard deviation; the bar represents the minimum and maximum values.

fluorescence detection was then used for quantification of the relative protein abundances. Subsequently, the membranes were scanned by the Odyssey scanner (LI-COR Biosciences) at 800 nm. The relative protein abundances for each sample are given in arbitrary units.

Electrophoresis and Quantification of Myosin Heavy Chain Isoforms. Three other biomarkers corresponded to MyHC and were determined according to the method of Picard et al.²⁴ using an adequate SDS-PAGE and expressed in percentage. Briefly, 100 mg of frozen muscle was ground in 5 mL of extraction buffer solution containing 0.5 M NaCl, 20 mM sodium pyrophosphate, 50 mM Tris, 1 mM EDTA, and 1 mM dithiothreitol. After 10 min at 4 °C on ice, the sample was centrifuged for 5 min at 5000g. Following centrifugation, the supernatant was diluted 1:1 (v/w) with glycerol at 87% and stored at –20 °C until use. The samples were then mixed with an equal volume of loading buffer containing 4% SDS (w/v), 125 mM Tris, pH 6.8, 20% glycerol (v/v), 10% β -mercaptoethanol (v/v), and 0.02% pyronin Y (w/v). The proteins were separated using 9.2% polyacrylamide gels. After staining, the gels were scanned, and the proportions of the different MyHCs bands were quantified by densitometry with ImageQuant Software 5500 (Amersham Biosciences/GE Healthcare). The band quantification revealed the existence of MyHC-IIb isoforms in only some animals (4 animals of 21). Consequently, MyHC-IIb percentages were totaled with those of MyHC-IIx, creating a new variable “MyHC-IIx+b” (fast glycolytic fibers).

Statistical Analysis. For descriptive statistics, raw data were used. For statistical analyses all data were standardized for replicate using the Proc Standard of SAS 9.2 to obtain Z scores. A Z score represents the number of standard deviations each observation is relative to the mean of the corresponding animal: $Z = ((x - \mu)/\sigma)$, where x is the raw value, μ is the mean of the population, and σ is the standard deviation of the same population.

The PROC CORR of SAS was used to determine the Pearson's correlation coefficients between the 21 biomarkers with pH and CIE- $L^*a^*b^*$ color coordinates. Correlation values were considered significant at $P < 0.05$.

For each pH value and each color coordinate, a principal component analysis (PCA) was carried out using PROC PRINCOMP of SAS, using only the correlated biomarkers. PCA aimed to illustrate visually the correlated biomarkers with pH and color coordinates. The overall Kaiser's measures of sampling adequacies of the performed PCAs were >0.68 for pH parameters and >0.80 for $L^*a^*b^*$ color coordinates.

Multiple regression analyses were performed using PROC REG of SAS to create best models (maximal adjusted R^2) for pH and color coordinates (as dependent variables) using the 21 protein biomarkers (as independent variables). Partial R -squares and significance of each retained variable are given for the models. Regression analyses were further conducted on L^* , a^* , and b^* color coordinates to study specifically the relationships with pH values and muscle fiber type composition.

The absence of collinearity was systematically verified for each model, by producing condition indices and variance proportions using the COLLIN procedure of SAS. Variables were identified as collinear if they possessed both a high condition index >10 and a proportion of variation >0.5 for two or more traits.

RESULTS

pH Parameters, Color Traits, and Biomarker Abundances. Average means of pH and color parameters are shown in Figure 1. pH measured 45 min post-mortem was $6.87 (\pm 0.10)$ and declined to $6.22 (\pm 0.20)$ 3 h post-mortem, reaching $5.57 (\pm 0.08)$ 30 h post-mortem (Figure 1a). Mean color coordinates were $36.9 (\pm 3.32)$ for lightness (L^*), $12.40 (\pm 1.74)$ for redness (a^*), and $15.81 (\pm 2.65)$ for yellowness (b^*) (Figure 1b). Relative abundances of biomarkers expressed in arbitrary units or in percentage (MyHC) are summarized in Table 2. The LT muscle was characterized by 19.2% (± 3.6) of type I fibers, 3.9% (± 4.3) of IIa, and 56.9% (± 4.0) of IIx/b.

Relationships between Biomarkers and pH Parameters. pH_u was correlated with pH_{45 min} ($r = 0.47$; $P < 0.05$) and pH_{3 h} ($r = 0.59$, $P < 0.01$). pH_{45 min} was correlated with pH_{3 h} ($r = 0.47$, $P < 0.05$). pH was further correlated with 11 biomarkers (Figure 2a). Prdx6 was negatively correlated with pH_{45 min} ($r = -0.49$, $P < 0.05$), pH_{3 h} ($r = -0.47$, $P < 0.05$), and pH_u ($r = -0.66$, $P < 0.01$). Hsp70-Grp75 and DJ-1 were negatively correlated with both pH_{3 h} ($r = -0.45$ and -0.56 , $P < 0.05$, respectively) and pH_u ($r = -0.45$ and -0.43 , $P < 0.05$, respectively). Actin was negatively correlated with pH_{45 min} and pH_u ($r = -0.40$, $P < 0.05$). MDH1 was negatively correlated ($r = -0.48$, $P < 0.05$) with pH_{45 min} only. MyBP-H ($r = -0.43$), ENO3 ($r = -0.46$), LDH-B ($r = -0.43$), and Hsp20 ($r = -0.50$) were significantly ($P < 0.05$) and negatively correlated with pH_{3 h}. MyHC-IIx/b (positively) and CapZ- β (negatively) were correlated with ultimate pH only ($r = 0.40$ and -0.55 , $P < 0.05$, respectively). The biomarkers that were significantly correlated with pH were introduced into PCAs (Figure 3). The first two PCA axes explained 80.7, 69.4, and 73.2% of the variability between animals of pH_{45 min} (Figure 3a), pH_{3 h} (Figure 3b), and pH_u (Figure 3c), respectively.

Regression Analyses of pH Parameters. The multiple linear regression analyses, using pH parameters as dependent and biomarker abundances as independent variables, revealed significant relationships (Table 3; Figure 4). For pH_{45 min}, 47% of the variability ($P < 0.01$) was explained by MDH1 and actin

Table 2. Mean and Standard Deviation (SD) of the 21 Protein Biomarkers Quantified in *Longissimus thoracis* Muscle of Blond d'Aquitaine Young Bulls

variable	mean	SD
heat shock proteins		
α B-crystallin	15.61	4.23
Hsp20	17.39	3.55
Hsp27	19.04	5.33
Hsp40	17.40	2.47
Hsp70-1A/B	17.40	3.10
Hsp70-8	17.85	1.64
Hsp70-Grp75	17.16	1.90
metabolism		
enolase 3	14.51	5.28
LDHB: lactate dehydrogenase chain B	19.69	3.89
MDH1: malate dehydrogenase 1	15.71	3.67
oxidative resistance		
DJ-1: Parkinson's disease protein 7	16.13	2.78
Prdx6: <i>cis</i> -peroxiredoxin	13.69	1.34
SOD1: superoxide dismutase Cu/Zn	16.26	1.36
proteolysis		
μ -calpain	16.50	1.99
structure		
CapZ- β : F-actin-capping protein subunit β	15.90	2.33
actin	19.45	3.58
MyBP-H: myosin binding protein H	15.18	2.94
MyLC-1F: myosin light chain 1F	15.74	1.47
MyHC-I: myosin heavy chain-I (%)	19.21	3.65
MyHC-IIA: myosin heavy chain-IIa (%)	23.85	4.34
MyHC-IIx/b: myosin heavy chain-IIx/b (%)	56.94	3.98

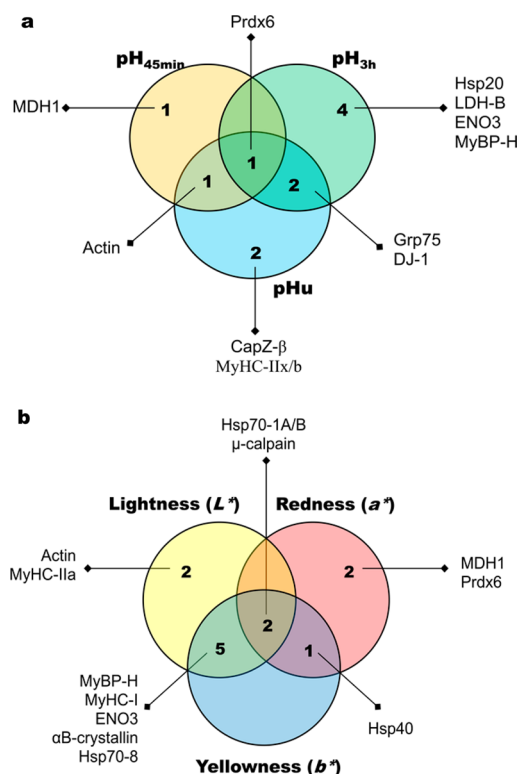


Figure 2. Venn diagrams depicting a summary of the number of biomarkers found significantly ($P < 0.05$) correlated with (a) pH parameters and (b) color coordinates. The directions of the correlations are presented in PCAs (Figures 3 and 5).

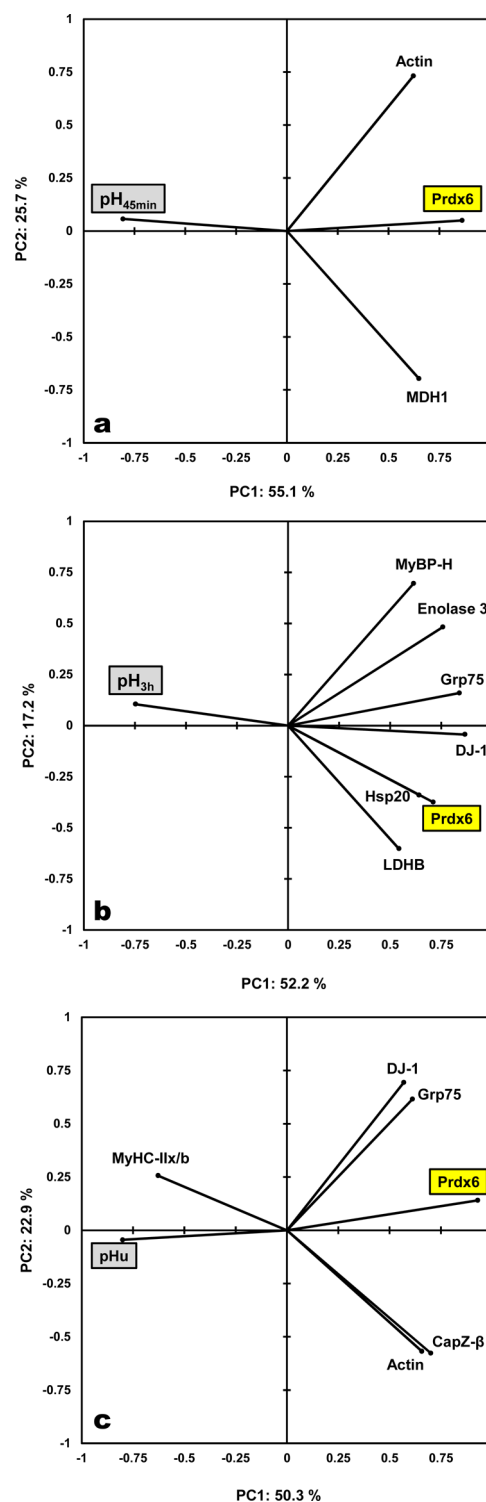


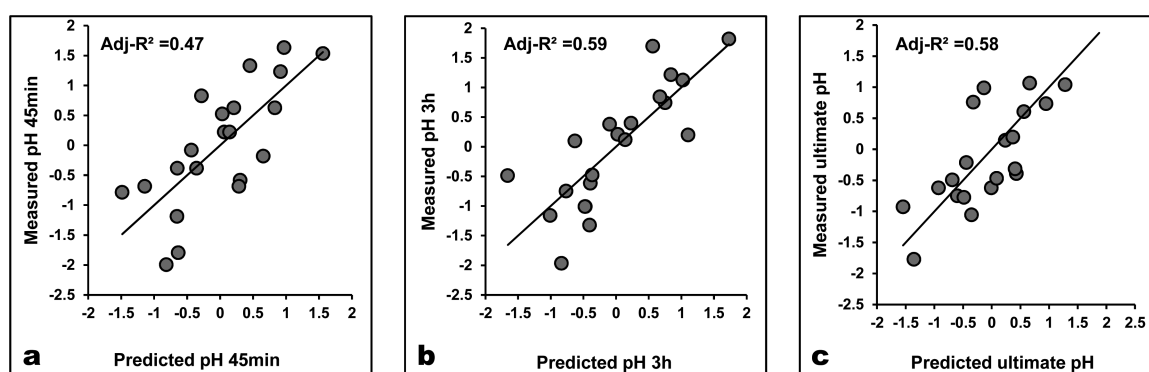
Figure 3. Principal component analyses showing relationships between (a) pH_{45 min}, (b) pH_{3 h}, and (c) pH_u and the correlated biomarkers.

(negative) and Hsp70-8 (positive). For pH_{3 h}, the model was almost similar to the pH_{45 min} model and explained 59% of the variability ($P < 0.001$) in terms of LDH-B and actin (negative) and Hsp70-8 (positive). If included, Hsp27 (negative) was retained ($P < 0.05$) in the model, which then explains 67% of the variability. For ultimate pH, it was not possible to construct a significant model with three variables. Hence, a fourth variable was included, producing a model explaining 58% of the variability

Table 3. Regression Equations of pH_{45 min}, pH_{3 h}, and Ultimate pH of *Longissimus thoracis* Muscle of Blond d'Aquitaine Young Bulls Using Protein Biomarkers

dependent variable	adj-R ^{2a}	SE	entered independent variable ^b	partial R ²	regression coefficient	t value	P value
pH _{45 min}	0.47**	0.17	MDH1	0.11	−0.55	−3.22	0.005
		0.20	actin	0.12	−0.65	−3.25	0.005
		0.20	Hsp70-8	0.25	+0.58	+2.86	0.011
pH _{3 h}	0.59***	0.15	LDHB	0.06	−0.66	−4.37	0.000
		0.18	Hsp70-8	0.29	+0.87	+4.74	0.000
		0.17	actin	0.25	−0.57	−3.24	0.005
pH _u	0.58***	0.19	Prdx6	0.31	−0.69	−3.72	0.002
		0.23	Hsp70-1A/B	0.08	+0.68	+3.00	0.008
		0.33	Hsp40	0.04	−0.86	−2.58	0.020
		0.24	MyLC-1F	0.15	+0.58	+2.41	0.028

^aSignificance of the models: **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. ^bVariables are shown in order of their entrance in the prediction models.

**Figure 4.** Correlations between measured and predicted pH_{45 min}, pH_{3 h}, and ultimate pH parameters using the best models. Adjusted R-squares corresponding to the prediction equations given in Table 3 for each parameter are shown.

($P < 0.001$): Prdx6 and Hsp40 (negatively) and Hsp70-1A/B and MyLC-1F (positively).

Relationships between Biomarkers and Meat Color Traits. Pearson correlation analyses revealed that the three measured color parameters were not correlated ($r < 0.29$). L^* , a^* , and b^* values were correlated with 12 biomarker abundances ($P < 0.05$; in Figure 2b). Hsp70-1A/B and μ -calpain were correlated with all color coordinates: negatively with L^* and positively with a^* and b^* (Figures 5 and Figure 6). These two proteins were correlated together ($r = 0.69$, $P < 0.001$). Five common correlations were found for L^* and b^* , although directions differed. L^* and b^* were correlated with α B-crystallin ($r = -0.56$ and 0.55 , $P < 0.05$, respectively), Hsp70-8 ($r = -0.68$ and 0.41 , $P < 0.05$; respectively), MyHC-I ($r = -0.53$ and 0.50 , $P < 0.05$, respectively), ENO3 ($r = 0.73$ and -0.55 , $P < 0.01$, respectively), and MyBP-H ($r = 0.44$ and -0.53 , $P < 0.05$, respectively). Hsp40 was positively correlated with both a^* and b^* ($r = 0.65$ and 0.45 , $P < 0.01$, respectively). Actin (negatively) and MyHC-IIa (positively) were correlated with L^* only ($r = -0.51$ and 0.46 , $P < 0.05$, respectively). MDH1 and Prdx6 were positively correlated with a^* only ($r = 0.63$ and 0.46 , $P < 0.01$, respectively). These two proteins were closely related ($r = 0.50$, $P < 0.05$). PCAs were carried out for each color coordinate, introducing only the correlated biomarkers. The first two axes of the PCA explained 68.8, 77.2, and 75.5% of the variability between animals of L^* (Figure 5a), a^* (Figure 5b), and b^* (Figure 5c), respectively.

Regression Models for Meat Color Traits. Simple correlations between pH values and color coordinates were

not significant ($-0.34 < r < 0.10$; $p > 0.13$). The regression models using $L^*a^*b^*$ coordinates as dependent and pH and fiber types as independent variables found a significant model only for L^* , explaining 37.9% of the variability with pH_u (13.5%; $P < 0.05$) and MyHC-I (24.4%; $P < 0.01$): $L^* = -0.4^* \text{pH}_u - 0.7^* \text{MyHC-I}$. The regression models using $L^*a^*b^*$ color traits as dependent and biomarker abundances as independent variables are presented in Table 4 and Figure 7. The models were significant and explained between 47 and 65% of variability. The model of L^* explained 65% of the variability between animals ($P < 0.0001$) by ENO3 (positive) and Hsp70-Grp75 (negative). The model of a^* explained 62% of the variability ($P < 0.001$) by Hsp40 (positive) and SOD1 and Hsp70-8 (both negative). The model of b^* explained 47% of the variability ($P < 0.01$) by μ -calpain (positive) and Hsp70-Grp75 (negative). Both L^* and b^* models included Hsp70-Grp75, explaining 17 and 24%, respectively. All of the $L^*a^*b^*$ color coordinate models included heat shock proteins, which explained between 17 and 50% of the variability.

DISCUSSION

Results indicate that L^* , a^* , and b^* color coordinates were unrelated among themselves and that only L^* was weakly correlated with ultimate pH. Earlier studies on pork and cattle found correlations between ultimate pH, L^* , and b^* .⁴ The absence of strong correlations with ultimate pH in the present study can be explained by the fact that ultimate pH values were within the normal range.⁵ Redness (a^*) is generally more influenced by early post-mortem pH. Particularly, at least in

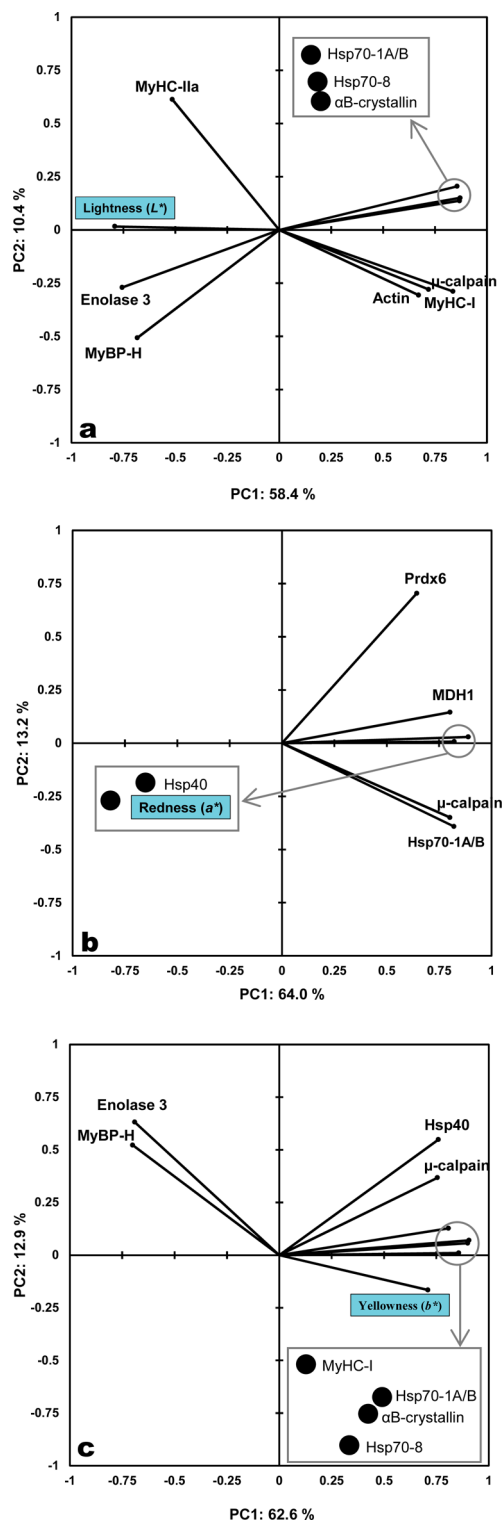


Figure 5. Principal component analyses showing relationships between (a) lightness (L^*), (b) redness (a^*), and (c) yellowness (b^*) and the correlated biomarkers.

pork, the combination of low early post-mortem thigh muscle temperature results in protein denaturation that leads to early inactivation of oxygen-consuming enzymes.⁵ This promotes formation of MbO₂, leading to higher a^* values.²⁵ The absence of a correlation in the present study may be due to the use of cattle rather than pigs and/or the narrow range of early post-mortem pH values, compared to the study by Lindahl et al.⁵

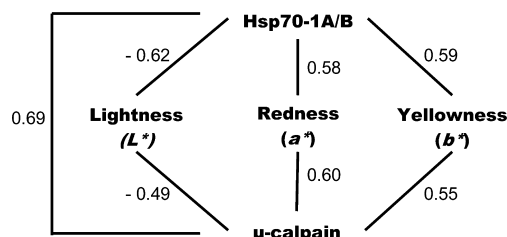


Figure 6. Pearson correlation analysis showing significant correlations ($P < 0.05$) between $L^*a^*b^*$ color coordinates and both Hsp70-1A/B and μ -calpain.

To increase our understanding of the biochemical mechanisms underlying post-mortem pH decline and color development in young Blond d'Aquitaine bulls, the following sections will discuss the relationships between these variables and the proteins (biomarkers) measured in the present study using the Dot-Bot technique.

Relationship between Biomarkers in the Early Post-Mortem Period and Post-Mortem pH Decline. $pH_{45 \text{ min}}$ PCA and regression analyses show that $pH_{45 \text{ min}}$ was correlated with four proteins (Actin, MDH1, Prdx6, and Hsp70-8), all implicated in apoptosis. Apoptosis is considered to start a few minutes after bleeding and to play a major role in the conversion of muscle to meat.^{12,26} Apoptosis is initiated due to the hypoxic state of the muscle cells resulting in changes in the inner mitochondrial cell membrane that cause the release of pro-apoptotic proteins into the cytoplasm.²⁶ These events activate the caspase cascade, which is central in the apoptotic process. Actin is the first protein targeted by caspases. Actin fragments can induce morphological changes resembling apoptotic cells and may be used as a probe for apoptosis detection.^{12,27} In coherence with our findings, proteomic studies found that in the early post-mortem period, actin fragments are released and that pH decline and actin degradation were closely related.^{12,28,29}

In the early post-mortem period, as long as glycolytic enzymes are not inhibited by low pH, glycolysis will continue, thus contributing to the acidification process. MDH1 plays a pivotal role in the malate–aspartate shuttle operating between cytosol and mitochondria, which may explain the correlation between MDH1 and $pH_{45 \text{ min}}$.³⁰ MDH1 may also be implicated in apoptosis, as in response to glucose deprivation, MDH1 regulates p53-dependent cell-cycle arrest and apoptosis.³¹

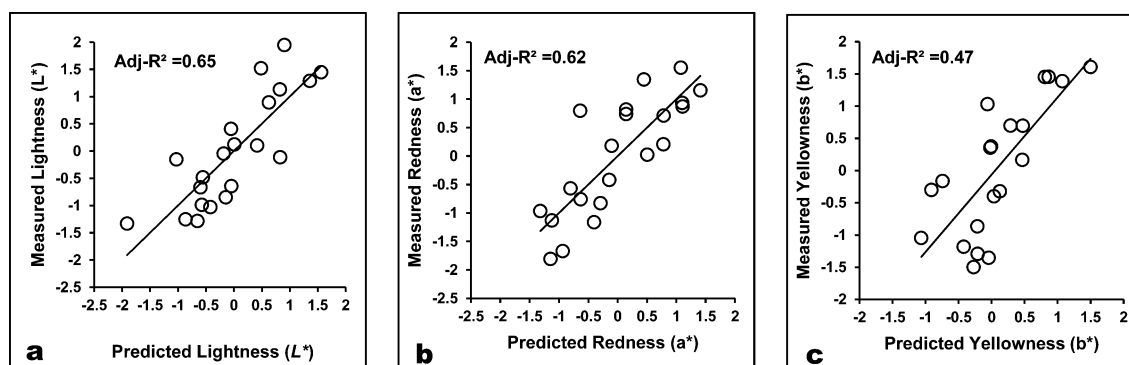
In our study, low $pH_{45 \text{ min}}$ was also associated with higher Prdx6, a bifunctional protein with both glutathione peroxidase (GPx, antioxidative) and phospholipase A2 (PLA₂) activities.³² The relationship between Prdx6 and pH decline may be partly explained by the activity of the PLA₂ group. This group plays a significant role in the hydrolysis of phosphatidylcholine (PC), which is a basic phospholipid present in cell membranes.³³ Phosphatidylserine (PS) is the acid phospholipid present in cell membranes. At the early stages of apoptosis, the phospholipid distribution in the cell membranes is inverted: PS switches to the external and PC to the internal leaflet of the membrane by a flip-flop process.^{26,34} Due to this inversion, protons generated by glycolysis may be partly absorbed and the acidification process may be slowed. Due to PLA₂ activity, PC will be hydrolyzed, reducing its buffering capacity and thus enhancing the rate of pH decline in the cytosol.

Hsp70-8, a member of the Hsp70 kDa family, was positively related to early post-mortem pH. This Hsp is constitutively expressed in most tissues and essential for survival. It has many

Table 4. Regression Equations of $L^*a^*b^*$ Meat Color Traits of *Longissimus thoracis* Muscle of Blond d'Aquitaine Young Bulls Using Protein Biomarkers

dependent variable	adj- R^{2a}	SE	entered independent variable ^b	partial R^2	regression coefficient	<i>t</i> value	<i>P</i> value
lightness (L^*)	0.65***	0.17	ENO 3	0.48	+1.05	+6.14	0.0001
		0.17	Hsp70-Grp75	0.17	−0.51	−2.99	0.008
redness (a^*)	0.62***	0.22	Hsp40	0.33	+1.22	+5.60	0.0001
		0.17	SOD1	0.12	−0.56	−3.38	0.004
		0.20	Hsp70-8	0.17	−0.57	−2.78	0.013
yellowness (b^*)	0.47**	0.17	μ -calpain	0.23	+0.64	+3.86	0.001
		0.17	Hsp70-Grp75	0.24	−0.48	−2.92	0.009

^aSignificance of the models: **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. ^bVariables are shown in order of their entrance in the prediction models.

**Figure 7.** Correlations between predicted and measured (a) lightness (L^*), (b) redness (a^*), and (c) yellowness (b^*) color traits using the best models. Adjusted R -squares corresponding to the prediction equations given in Table 4 for each parameter are shown.

housekeeping chaperoning functions including folding of nascent polypeptides, protein translocation across membranes, chaperone-mediated autophagy, and prevention of protein aggregation under stress conditions.³⁵ Due to its protective functions, increased metabolic activity may have led to increased levels and vice versa, explaining its relationship with early post-mortem pH.

pH_{3h} . PCA and regression analyses show that 3 h post-mortem, the biological pathways appear partly similar to those involved in pH_{45min} . Several other proteins are also involved, and these new relationships become apparent due to the greater time span during which protons have been able to accumulate. The correlated proteins are implicated in glycolysis (ENO3 and LDH-B), heat stress (Hsp20, Hsp70-Grp75, and Hsp70-8), oxidative resistance (Prdx6 and DJ-1), and structure (actin and MyBP-H). Results show that high levels of these biomarkers 45 min post-mortem predict low pH about 2 h later. ENO3 and LDH-B are glycolytic enzymes, and their negative association with pH_{3h} is undoubtedly explained by a faster energy metabolism resulting in a faster pH decline.

High levels of MyBP-H proteins at 45 min post-mortem predicted also low pH_{3h} post-mortem. MyBP-H is a cytoskeletal protein interacting with myosin thick filaments in the A-band.³⁶ Its relationship with pH_{3h} may have been indirect as higher MyBP-H levels were associated with higher levels of ENO3 and LDH-B. The Dot-Blot protocol used in the present study allowed revealing both intact and fragmented protein molecules in the soluble fraction. Higher MyBP-H levels in the early post-mortem period would suggest a faster fragmentation of these structural proteins, which may result from a faster early post-mortem metabolism.

Higher Hsp20 levels may occur in response to metabolic activity and pH decline, to stabilize myofibrillar proteins.³⁷ For example,

Lomiwes et al.³⁸ demonstrated that a slight decrease in post-mortem muscle pH induces a rapid binding of another small Hsp of the same family, α B-crystallin, to the myofibril. Higher Hsp20 levels 45 min post-mortem may thus have been indicative of a faster metabolism and consequently be predictive of lower pH_{3h} .

Hsp70-Grp75 was related to pH_{3h} , pH_w , and b^* color coordinates. Hsp70-Grp75 is a cytoprotective chaperone present in nearly all cellular compartments and induced by glucose deprivation, Ca^{2+} influx, or agents perturbing glycolysis.³⁹ It assists in the import and folding of mitochondrial proteins and protects cells from glucose deprivation and ROS accumulation.⁴⁰ Its protective function may explain the relationship between its higher levels at 45 min post-mortem and the subsequent faster pH decline. Hsp70-Grp75 sequesters and inactivates p53, preventing its nuclear translocation and apoptosis.⁴¹ Hsp70-Grp75 may thus slow apoptotic and other processes involved in the conversion of muscle to meat. In addition, Hsp70-Grp75 links the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor of the endoplasmic reticulum to the mitochondrial voltage-dependent anion channels, presumably enhancing Ca^{2+} trafficking from the endoplasmic reticulum toward the mitochondria.¹² This mechanism may also contribute to the relationship between Hsp70-Grp75 and pH decline as Ca^{2+} exerts regulatory effects on many enzymes and proteins involved in metabolic and apoptotic processes including in the post-mortem muscle.^{12,42}

The different functions of Prdx6 have been discussed above. Hence, increased Prdx6 levels 45 min post-mortem predicted low pH 3 h post-mortem probably partly due to its PLA_2 activity on pH decline. In addition, 3 h post-mortem pH was around 6.2 and less unfavorable for the activity of the GPx group of Prdx6.³² Thus, approaching 3 h post-mortem, Prdx6 may have acted as an antioxidant, thereby protecting metabolic activity.

DJ-1 is another antioxidant protein present in the cytoplasm as well as in intracellular organelles and scavenges H_2O_2 through oxidation of Cys-106.⁴³ DJ-1 is further believed to promote the expression of a number of mitochondrial enzymes involved in reactive oxygen species (ROS) removal.⁴⁴ Its association with increased levels of glycolytic enzymes and Prdx6 is coherent with its association with a faster early post-mortem pH decline.

Ultimate pH. Ultimate pH was earlier found to be correlated with levels of various muscle proteins present in beef and pork muscles 45 min post-mortem.¹¹ In the present study, high levels of structural proteins (actin, CapZ- β , MyLC-1F, and MyHC-IIx/b), chaperones (Hsp70-Grp75, Hsp70-1A/B, and Hsp40), and oxidative resistance (DJ-1 and Prdx6) proteins 45 min post-mortem predicted low pH_u . In contrast to $\text{pH}_{45 \text{ min}}$ and $\text{pH}_{3 \text{ h}}$, low pH_u was not predicted by high levels of glycolytic enzymes, although pH values at different post-mortem intervals were correlated. This is coherent with the knowledge that the glycolytic rate is not the sole determining factor for pH_u . The extent of pH decline may be reduced if glycogen reserves are limiting. In the present experiment, preslaughter stress levels were low and glycogen levels were not the limiting factor as we have recently showed that 24 h post-mortem the muscles of the same BA bulls contained residual glycogen.²¹ If glycogen content is not the limiting factor, glycolysis stops due to other factors, probably related to the disappearance of AMP and the inactivation of glycolytic enzymes.⁴⁵

High actin and CapZ- β contents 45 min post-mortem predicted low pH_u . CapZ- β is located in the Z band of the muscle sarcomere and caps the barbed (plus) end of actin filaments, inhibiting polymerization.⁴⁶ A proteomic study found that CapZ- β was retained in the insoluble fraction of the protein extraction and that levels declined during the 48 h following slaughter,¹⁰ indicative of progressive CapZ- β fragmentation or detachment from the Z band. As for MyBP-H (cf. above), the higher levels of actin and CapZ- β in the early post-mortem period would suggest a relatively fast fragmentation of these structural proteins. The association between faster structural protein degradation and higher levels of protective proteins (Prdx6, DJ-1, Hsp70-Grp75) 45 min post-mortem may thus express a faster metabolism. The association between higher levels of protective proteins and lower pH_u suggests that these pathways effectively protected the cell against adverse events such as oxidative stress, presumably retarding apoptosis and preserving energy metabolism. The association between high MyHC-IIx/b content and high ultimate pH may seem unexpected. A higher MyHC-IIx/b content is usually associated with higher glycogen content and a potential for a faster metabolism, which, depending on the slaughter conditions, may result in a lower, rather than a higher, pH_u .³

Meat Color Traits. Mean L^* values of the meat samples of the BA breed were within the range of normal values.⁴⁷ The redness (a^*) values were lower and yellowness (b^*) values were higher than those reported in the literature.⁴⁸ This may be partly due to the relatively high content of glycolytic fibers of the LT muscle of the BA breed.²⁰ These fibers contain less myoglobin, resulting in lower redness, and are less efficient in oxygen exchange compared to oxidative fibers, resulting in a less reductive environment and thus promoting MbO_2 formation with a net result of greater yellowness.²⁵

Relationships between Biomarkers and Meat Color Traits. PCA and regression analyses showed that L^* , a^* , and b^* values were correlated with 10, 7, and 10 biomarker abundances, respectively. L^* and b^* showed seven correlations with the same proteins but in the opposite direction. The present study used

proteins related to various beef sensory qualities including tenderness.¹⁴ Although proteomic studies on pork, beef, and fish found relationships between color and proteins involved in muscle contraction, metabolism, heat stress, signaling, and other functions,^{16–19} little information exists on the relationships between beef color and biomarkers validated for other meat qualities.⁴⁹

In the present study, μ -calpain and Hsp70-1A/B were correlated with the three color coordinates. Similarly, Joseph et al.¹⁸ identified three overabundant chaperone proteins that were related to beef meat color stability, including a Hsp-1B of 70 kDa. Kwasiborski et al.¹¹ found a negative correlation between abundance of an Hsp70 isoform (Hsp72 or Hsp70-1A/B) 45 min post-mortem and L^* in pig LT muscles. Hsp70-1A/B is a member of the inducible Hsp70 family and is abundantly induced in response to cellular stress, possibly due to its function to preserve proteins.⁴⁰ One hypothesis is that inducible Hsp70s and μ -calpain influence certain meat color coordinates interactively. First, post-mortem ROS damage of the endoplasmic reticulum of the cells leads to the liberation of Ca^{2+} in the cytosol, which activates μ -calpain. Structural proteins are a major substrate of μ -calpain, and their characteristics influence meat color aspects. Second, inducible Hsp70s may interfere in this process. Post-mortem, oxidative stress induced by a product of lipid peroxidation, 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), an α,β -unsaturated aldehyde,⁸ causes carbonylation of Hsp70,⁵⁰ thus inactivating it. It was recently reported that in monkey hippocampal CA1 neurons, carbonylated Hsp70s are key substrates of μ -calpain.⁵¹ If this pathway exists also in muscle, the carbonylated forms of inducible Hsp70 may be hydrolyzed by μ -calpain.⁵¹ 4-HNE may also contribute to the phenomenon as it may cause disruption of Ca^{2+} homeostasis, membrane and structure damage, and cell death.⁵² In support of this hypothesis, 4-HNE was reported to affect meat color by formation of several adducts with muscle proteins, thus modifying protein functionality.^{53,54} Thus, increased levels of carbonylated Hsp70s will protect structural proteins against μ -calpain activity, thereby deferring changes in the structure of pigment and myofibrillar proteins, influencing hence reflectance and other aspects of meat color. Inducible Hsp70 binds also with membrane phospholipids⁵⁵ and interacts with PLA2 activity⁵⁶ and may thus participate in reactions involving phospholipids, pH decline, and apoptosis onset.

Other Hsps were also correlated with color coordinates. Hsp70-8 and α B-crystallin were negatively and positively correlated with L^* and b^* , respectively. Hsp40 was positively correlated with a^* . Other studies found also relationships between Hsp contents of the early post-mortem muscle and color coordinates. Zhang et al.⁵⁷ reported opposite relationships between Hsp90 contents in the early post-mortem muscle and L^* and b^* in pigs. The involvement of Hsps in meat color may be in part related to their protective role against protein denaturation known to affect the reflectance of meat aspects.¹⁹ Overall, these relationships indicate that inducible and constitutively expressed Hsps may play a major role in the determination of meat color.

The association between slow twitch oxidative fibers (type I) and L^* and b^* coordinates may be related to their relatively high content of myoglobin, which explains part of the variation in meat color.²⁵ In addition, they contain high levels of inducible Hsp70, of which the potential role has been described above.

The positive correlation between redness (a^*) and Prdx6 can be explained by the involvement of the GPx group, which has antioxidative properties. Tang et al.⁵⁸ reported that adding glutathione to bovine muscle cytosol improved MbO_2 redox stability, allowing increased redness. The present study found

also a positive correlation between MDH1 and a^* values. Glycolytic enzymes were earlier found to be positively correlated with redness (a^*) in beef.^{16,18} In the presence of a reductor, MetMb can be converted back into Mb. The reduction process is primarily enzymatic in nature with NADH as cofactor and can take place under anaerobic or aerobic conditions.¹ The glycolytic pathway allows the production of NADH,^{1,59} which may explain the correlation between a^* and MDH1.

While many studies have shown relationships between beef color and protein biomarkers after ≥ 24 h post-mortem, the present study shows that protein biomarkers present in the early post-mortem period may predict subsequent pH decline and color development. Overall, the results show that correlations between pH decline, meat color coordinates, and protein biomarkers reflect existing knowledge on post-mortem muscle processes involved in pH decline and meat color determinism. The role of the distribution of muscle fibers is probably due to their myoglobin content, directly influencing color, and mitochondria content, involved in the initiation of the apoptosis process. The involvement of Hsps and oxidative proteins is explained by their protective functions, thereby preserving metabolism and retarding proteolysis and apoptosis onset. Antioxidants maintain further the redox state, thus stabilizing myoglobin. Prdx6 plays an important role, probably due to its dual functions of antioxidant and phospholipase activities. Enzymes of the glycolytic pathways influence pH decline and thus, indirectly, color stability, but deliver also energy and cofactors (NADH) allowing reduction of MetMb. The degree of fragmentation of structural proteins reveals the proteolytic and apoptotic status of the cell, and being substrates that may also enhance these processes. pH plays an important role as it influences the activity of at least part of the proteins (e.g., sHsps and Prdx6).

Thus, several of the tested biomarkers have been identified as being relevant for the traits of interest, and their relationships with the traits have been discussed in terms of possible underlying biochemical mechanisms. Before these biomarkers can be used as an industrial tool, further developments are needed. For example, the robustness of the relationship, in terms of breed, gender, feeding regimen, and muscle, should be investigated. The knowledge presented here should allow a greater understanding of similarities but also of differences that may exist with other animal types than the one studied. In addition, techniques for routine measurements must be developed (for example, Dot-Blot or antibody microarray techniques^{13,60}). Once developed, the meat industry may benefit from the use of biomarkers as a tool for investigation, monitoring, or decision/management. In addition, knowledge of the biochemical pathways involved in meat color development and stability may be used to control or improve meat aspects under field conditions. As indicated above, addition of pyruvate to beef cuts improved meat color, as pyruvate regenerates NADH through the TCA cycle, leading to MetMb reduction.⁸ Similar results were obtained for the addition of NAD⁺, lactate, or LDH.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

* (B.P.) Phone: 33 4 73 62 40 56. Fax: 33 4 73 62 46 39. E-mail: brigitte.picard@clermont.inra.fr.

Funding

This work was part of the EU FP6 Integrated Project ProSafeBeef, Contract FOODCT-2006-36241 (INRA Quality Assurance AQ284). Funding by the European Union is gratefully acknowledged with respect to animal production and laboratory

analyses. We are further thankful to the Franco-Algerian PROFAS B+ program for the financial support given to M.G. (Ph.D.).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank INRA UERT (Theix) for animal management and slaughter.

REFERENCES

- (1) Mancini, R. A.; Hunt, M. C. Current research in meat color. *Meat Sci.* **2005**, *71*, 100–121.
- (2) Mancini, R. A. 4 – Meat color. In *Improving the Sensory and Nutritional Quality of Fresh Meat*; Kerry, J. P., Ledward, D., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridge, UK, 2009; pp 89–110.
- (3) Renerre, M.; Anton, M.; Gatellier, P. Autoxidation of purified myoglobin from two bovine muscles. *Meat Sci.* **1992**, *32*, 331–342.
- (4) Abril, M.; Campo, M. M.; Önenç, A.; Sañudo, C.; Albertí, P.; Negueruela, A. I. Beef colour evolution as a function of ultimate pH. *Meat Sci.* **2001**, *58*, 69–78.
- (5) Lindahl, G.; Henckel, P.; Karlsson, A. H.; Andersen, H. J. Significance of early postmortem temperature and pH decline on colour characteristics of pork loin from different crossbreeds. *Meat Sci.* **2006**, *72*, 613–623.
- (6) Boudjellal, A.; Becila, S.; Coulis, G.; Herrera-Mendez, C. H.; Aubry, L.; Lepetit, J.; Harhoura, K.; Sentandreu, M. A.; Ait-Amar, H.; Ouali, A. Is the pH drop profile curvilinear and either monophasic or polyphasic? Consequences on the ultimate bovine meat texture. *Afr. J. Agric. Res.* **2008**, *3*, 195–204.
- (7) Suman, S. P.; Joseph, P. Myoglobin chemistry and meat color. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2013**, *4*, 79–99.
- (8) Joseph, P.; Nair, M. N.; Suman, S. P. Application of proteomics to characterize and improve color and oxidative stability of muscle foods. *Food Res. Int.* **2015**, DOI: 10.1016/j.foodres.2015.05.041.
- (9) Faustman, C.; Liebler, D. C.; McClure, T. D.; Sun, Q. α,β -Unsaturated aldehydes accelerate oxymyoglobin oxidation. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3140–3144.
- (10) Bjarnadottir, S. G.; Hollung, K.; Faergestad, E. M.; Veiseth-Kent, E. Proteome changes in bovine longissimus thoracis muscle during the first 48 h postmortem: shifts in energy status and myofibrillar stability. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 7408–7414.
- (11) Kwasiborski, A.; Sayd, T.; Chambon, C.; Sante-Lhoutellier, V.; Rocha, D.; Terlouw, C. Pig Longissimus lumborum proteome: Part II: Relationships between protein content and meat quality. *Meat Sci.* **2008**, *80*, 982–996.
- (12) Ouali, A.; Gagaoua, M.; Boudida, Y.; Becila, S.; Boudjellal, A.; Herrera-Mendez, C. H.; Sentandreu, M. A. Biomarkers of meat tenderness: present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanisms involved. *Meat Sci.* **2013**, *95*, 854–870.
- (13) Picard, B.; Lebre, B.; Cassar-Malek, I.; Liaubet, L.; Berri, C.; Le Bihan-Duval, E.; Hocquette, J. F.; Renand, G. Recent advances in omic technologies for meat quality management. *Meat Sci.* **2015**, DOI: 10.1016/j.meatsci.2015.05.003.
- (14) Picard, B.; Gagaoua, M.; Micol, D.; Cassar-Malek, I.; Hocquette, J. F.; Terlouw, C. E. Inverse relationships between biomarkers and beef tenderness according to contractile and metabolic properties of the muscle. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 9808–9818.
- (15) Guillemain, N.; Meunier, B.; Jurie, C.; Cassar-Malek, I.; Hocquette, J. F.; Leveziel, H.; Picard, B. Validation of a Dot-Blot quantitative technique for large scale analysis of beef tenderness biomarkers. *J. Physiol. Pharmacol.* **2009**, *60* (Suppl. 3), 91–97.
- (16) Canto, A. C.; Suman, S. P.; Nair, M. N.; Li, S.; Rentfrow, G.; Beach, C. M.; Silva, T. J.; Wheeler, T. L.; Shackelford, S. D.; Grayson, A.; McKeith, R. O.; King, D. A. Differential abundance of sarcoplasmic proteome explains animal effect on beef Longissimus lumborum color stability. *Meat Sci.* **2015**, *102*, 90–98.

- (17) Desai, M. A.; Joseph, P.; Suman, S. P.; Silva, J. L.; Kim, T.; Schilling, M. W. Proteome basis of red color defect in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fillets. *LWT – Food Sci. Technol.* **2014**, *57*, 141–148.
- (18) Joseph, P.; Suman, S. P.; Rentfrow, G.; Li, S.; Beach, C. M. Proteomics of muscle-specific beef color stability. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 3196–3203.
- (19) Sayd, T.; Morzel, M.; Chambon, C.; Franck, M.; Figwer, P.; Larzul, C.; Le Roy, P.; Monin, G.; Cherel, P.; Laville, E. Proteome analysis of the sarcoplasmic fraction of pig semimembranosus muscle: implications on meat color development. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 2732–2737.
- (20) Listrat, A.; Picard, B.; Jailler, R.; Collignon, H.; Peccatte, J.-R.; Micol, D.; Geay, Y.; Dozias, D. Grass valorisation and muscular characteristics of blonde d'Aquitaine steers. *Ann. Zootech.* **2001**, *50*, 105–118.
- (21) Bourguet, C.; Deiss, V.; Boissy, A.; Terlouw, E. M. C. Young Blond d'Aquitaine, Angus and Limousin bulls differ in emotional reactivity: relationships with animal traits, stress reactions at slaughter and post-mortem muscle metabolism. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2015**, *164*, 41–55.
- (22) Bouley, J.; Chambon, C.; Picard, B. Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* **2004**, *4*, 1811–1824.
- (23) Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- (24) Picard, B.; Barboiron, C.; Chadeyron, D.; Jurie, C. Protocol for high-resolution electrophoresis separation of myosin heavy chain isoforms in bovine skeletal muscle. *Electrophoresis* **2011**, *32*, 1804–1806.
- (25) Lindahl, G.; Lundstrom, K.; Tornberg, E. Contribution of pigment content, myoglobin forms and internal reflectance to the colour of pork loin and ham from pure breed pigs. *Meat Sci.* **2001**, *59*, 141–151.
- (26) Ouali, A.; Herrera-Mendez, C. H.; Coulis, G.; Becila, S.; Boudjellal, A.; Aubry, L.; Sentandreu, M. A. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Sci.* **2006**, *74*, 44–58.
- (27) Mashima, T.; Naito, M.; Tsuruo, T. Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal actin plays a positive role in the process of morphological apoptosis. *Oncogene* **1999**, *18*, 2423–2430.
- (28) Morzel, M.; Terlouw, C.; Chambon, C.; Micol, D.; Picard, B. Muscle proteome and meat eating qualities of Longissimus thoracis of “Blonde d'Aquitaine” young bulls: a central role of HSP27 isoforms. *Meat Sci.* **2008**, *78*, 297–304.
- (29) Rasolofoharitseheno, H.; Mompoti, W.; Boudida, Y.; Gagaoua, M. Highlighting the degradation of actin in *Longissimus dorsi* muscle of different species: bovine, ovine, caprine, poultry and freshwater fish. *Br. Biotechnol. J.* **2015**, *7*, 169–176.
- (30) Birktoft, J. J.; Fernley, R. T.; Bradshaw, R. A.; Banaszak, L. J. Amino acid sequence homology among the 2-hydroxy acid dehydrogenases: mitochondrial and cytoplasmic malate dehydrogenases form a homologous system with lactate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1982**, *79*, 6166–6170.
- (31) Lee, S. M.; Kim, J. H.; Cho, E. J.; Youn, H. D. A nucleocytoplasmic malate dehydrogenase regulates p53 transcriptional activity in response to metabolic stress. *Cell Death Differ.* **2009**, *16*, 738–748.
- (32) Fisher, A. B. Peroxiredoxin 6: a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A(2) activities. *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, *15*, 831–844.
- (33) Manevich, Y.; Shuvaeva, T.; Dodia, C.; Kazi, A.; Feinstein, S. I.; Fisher, A. B. Binding of peroxiredoxin 6 to substrate determines differential phospholipid hydroperoxide peroxidase and phospholipase A(2) activities. *Arch. Biochem. Biophys.* **2009**, *485*, 139–149.
- (34) Martin, S. J.; Reutelingsperger, C. P.; McGahon, A. J.; Rader, J. A.; van Schie, R. C.; LaFace, D. M.; Green, D. R. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* **1995**, *182*, 1545–1556.
- (35) Dugaard, M.; Rohde, M.; Jaattela, M. The heat shock protein 70 family: highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 3702–3710.
- (36) Vaughan, K. T.; Weber, F. E.; Ried, T.; Ward, D. C.; Reinach, F. C.; Fischman, D. A. Human myosin-binding protein H (MyBP-H): complete primary sequence, genomic organization, and chromosomal localization. *Genomics* **1993**, *16*, 34–40.
- (37) Golenhofen, N.; Perng, M. D.; Quinlan, R. A.; Drenckhahn, D. Comparison of the small heat shock proteins α B-crystallin, MKBP, HSP25, HSP20, and α HSP in heart and skeletal muscle. *Histochem. Cell Biol.* **2000**, *122*, 415–425.
- (38) Lomiwes, D.; Hurst, S. M.; Dobbie, P.; Frost, D. A.; Hurst, R. D.; Young, O. A.; Farouk, M. M. The protection of bovine skeletal myofibrils from proteolytic damage post mortem by small heat shock proteins. *Meat Sci.* **2014**, *97*, 548–557.
- (39) Wiedemann, N.; Frazier, A. E.; Pfanner, N. The protein import machinery of mitochondria. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 14473–14476.
- (40) Mayer, M. P. Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. *Trends Biochem. Sci.* **2013**, *38*, 507–514.
- (41) Kaul, S. C.; Deocaris, C. C.; Wadhwa, R. Three faces of mortalin: a housekeeper, guardian and killer. *Exp. Gerontol.* **2007**, *42*, 263–274.
- (42) Glancy, B.; Balaban, R. S. Role of mitochondrial Ca^{2+} in the regulation of cellular energetics. *Biochemistry* **2012**, *51*, 2959–2973.
- (43) Kinumi, T.; Kimata, J.; Taira, T.; Ariga, H.; Niki, E. Cysteine-106 of DJ-1 is the most sensitive cysteine residue to hydrogen peroxide-mediated oxidation in vivo in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *317*, 722–728.
- (44) Clements, C. M.; McNally, R. S.; Conti, B. J.; Mak, T. W.; Ting, J. P. DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 15091–15096.
- (45) Sales, J.; Mellett, F. D. Post-mortem pH decline in different ostrich muscles. *Meat Sci.* **1996**, *42*, 235–238.
- (46) Zigmond, S. H. Beginning and ending an actin filament: control at the barbed end. In *Current Topics in Developmental Biology*; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2004; Vol. 63, pp 145–188.
- (47) Priolo, A.; Micol, D.; Agabriel, J. Effects of grass feeding systems on ruminant meat colour and flavour. A review. *Ann. Zootech.* **2001**, *50*, 185–200.
- (48) Gil, M.; Serra, X.; Gispert, M.; Angels Oliver, M.; Sanudo, C.; Panea, B.; Olleta, J. L.; Campo, M.; Olivan, M.; Osoro, K.; Garcia-Cachan, M. D.; Cruz-Sagredo, R.; Izquierdo, M.; Espejo, M.; Martin, M.; Piedrafitra, J. The effect of breed-production systems on the myosin heavy chain 1, the biochemical characteristics and the colour variables of Longissimus thoracis from seven Spanish beef cattle breeds. *Meat Sci.* **2001**, *58*, 181–188.
- (49) Gagaoua, M.; Durand, D.; Micol, D.; Santé-Lhoutellier, V.; Terlouw, C.; Ellies-Oury, M. P.; Boudjellal, A.; Hocquette, J. F.; Picard, B. Biomarkers of meat sensory qualities of Angus beef breed: towards the development of prediction equations. In *ISèmes JSMTV; Viandes & Produits Carnés*; Clermont-Ferrand, France, 2014; pp 137–138.
- (50) Carbone, D. L.; Doorn, J. A.; Kiebler, Z.; Sampey, B. P.; Petersen, D. R. Inhibition of Hsp72-mediated protein refolding by 4-hydroxy-2-nonenal. *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17*, 1459–1467.
- (51) Sahara, S.; Yamashima, T. Calpain-mediated Hsp70.1 cleavage in hippocampal CA1 neuronal death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *393*, 806–811.
- (52) Esterbauer, H.; Schaur, R. J.; Zollner, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biol. Med.* **1991**, *11*, 81–128.
- (53) Suman, S. P.; Faustman, C.; Stamer, S. L.; Liebler, D. C. Redox instability induced by 4-hydroxy-2-nonenal in porcine and bovine myoglobins at pH 5.6 and 4 degrees C. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 3402–3408.
- (54) Ramanathan, R.; Mancini, R. A.; Suman, S. P.; Beach, C. M. Covalent binding of 4-hydroxy-2-nonenal to lactate dehydrogenase

decreases NADH formation and metmyoglobin reducing activity. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 2112–2117.

(55) Harada, Y.; Sato, C.; Kitajima, K. Complex formation of 70-kDa heat shock protein with acidic glycolipids and phospholipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *353*, 655–660.

(56) Mahalka, A. K.; Code, C.; Jahromi, B. R.; Kirkegaard, T.; Jaattela, M.; Kinnunen, P. K. Activation of phospholipase A2 by Hsp70 in vitro. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2011**, *1808*, 2569–2572.

(57) Zhang, M.; Wang, D.; Geng, Z.; Bian, H.; Liu, F.; Zhu, Y.; Xu, W. The level of heat shock protein 90 in pig *Longissimus dorsi* muscle and its relationship with meat pH and quality. *Food Chem.* **2014**, *165*, 337–341.

(58) Tang, J.; Faustman, C.; Lee, S.; Hoagland, T. A. Effect of glutathione on oxymyoglobin oxidation. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 1691–1695.

(59) Rennerre, M.; Labas, R. Biochemical factors influencing metmyoglobin formation in beef muscles. *Meat Sci.* **1987**, *19*, 151–165.

(60) Picard, B.; Meunier, B.; Barboiron, C.; Dunoyer, N.; Guillemin, N.; Micol, D. From protein markers to phenotyping tools for evaluation of beef tenderness. In *Farm Animal Proteomics*; Rodrigues, P., Eckersall, D., Almeida, A., Eds.; Wageningen Academic Publishers: Wageningen, The Netherlands, 2012; pp 165–168.

Supplément n°01 publication n°04

Supplément 1 publication n° 04

Proteomic biomarkers of meat colour of Blonde d'Aquitaine young bulls: towards a better comprehension of the biological mechanisms

M. Gagaoua, E.M.C. Terlouw, D. Micol, A. Boudjellal, J.F. Hocquette, B. Picard

Publié dans proceeding of 61th ICoMST 2015, Clermont-Ferrand-France

Résumé :

Parmi les caractéristiques de la qualité de la viande, la couleur semble être un critère important dictant les décisions à l'achat de la viande. Le présent travail fournit de nouvelles hypothèses sur les mécanismes impliqués dans le déterminisme de la couleur de la viande chez les jeunes taurillons de la race Blonde d'Aquitaine en utilisant une liste de biomarqueurs établie par notre groupe. Les relations entre cette liste de biomarqueurs et les paramètres de la couleur $L^*a^*b^*$ dans le muscle *Longissimus thoracis* de 21 jeunes taurillons de la race Blonde d'Aquitaine ont été investiguées. Les coordonnées $L^*a^*b^*$ ont été corrélées avec 9, 5 et 8 des 21 biomarqueurs, respectivement. Des modèles de régression expliquent entre 47 et 65% de la variabilité entre les coordonnées $L^*a^*b^*$ de la couleur. Les résultats suggèrent que le développement de la couleur et de la tendreté partagent des voies métaboliques communes. Nos résultats montrent pour la première fois que la protéine du stress thermique Hsp70-1A/B et la μ -calpaine influencent interactivement les trois paramètres de la couleur de la viande de la race Blonde d'Aquitaine.

Mots clés : Bovin; Blonde d'Aquitaine ; couleur de la viande ; pH ; biomarqueurs ; *post-mortem* ; mécanismes biologiques.

PROTEOMIC BIOMARKERS OF MEAT COLOUR OF BLONDE D'AQUITAINE YOUNG BULLS: TOWARDS A BETTER COMPREHENSION OF THE BIOLOGICAL MECHANISMS

Mohammed Gagaoua^{1,3}, E. M. Claudia Terlouw^{1,2}, Didier Micol^{1,2}, Abdelghani Boudjellal³, Jean-François Hocquette^{1,2}, Brigitte Picard^{1,2}

¹ INRA, UMR 1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès- Champanelle, France

² Clermont Université, VetAgro Sup, UMR 1213 Herbivores, B.P. 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

³ Equipe Maquav, INATAA, Université des Frères Mentouri Constantine 1, Route de Ain El-Bey, 25000 Constantine, Algeria

Abstract – Relationships with CIE- $L^*a^*b^*$ colour traits of protein biomarkers known to be related to tenderness were studied in *Longissimus thoracis* muscles from 21 French Blonde Aquitaine young bulls. L^* , a^* and b^* coordinates were correlated with 9, 5 and 8 of the 21 biomarkers, respectively. Regression models explained between 47 and 65% of the variability between individuals in $L^*a^*b^*$ values. Results suggest that development of colour and tenderness may share common biological pathways. They further show that inducible Hsp70s and μ -calpain influence the three colour parameters interactively.

Key Words – beef meat, biomarkers, colour, biological mechanisms.

I. INTRODUCTION

Meat industry needs to predict and control meat quality to guarantee good quality to consumers. Over the last decade, a number of biomarkers were found to be related to the underlying mechanisms which determine tenderness and which may help increase the economic value of meat [1]. These biomarkers are representative of several biological functions and were recently used to propose prediction equations of meat sensory qualities [2, 3]. Among meat quality characteristics, colour appears important in dictating meat purchase decisions [4]. The present work provides new insights in mechanisms involved in the determinism of the colour of meat of young bulls of the Blonde d'Aquitaine (BA) breed, using the above mentioned biomarkers. The BA breed produces meat of good quality but with a light colour which may hamper purchase by consumers.

II. MATERIALS AND METHODS

This study used 21 young bulls of the BA breed finished over two consecutive years (two replicated groups). At 12 months of age, they were subjected to a 105 day finishing period until slaughter. Diets consisted of concentrate (75%) and straw (25%).

Animals were slaughtered at about 500 days of age at a live weight around 635 kg. They were slaughtered at the experimental abattoir of the INRA Research centre in compliance with the current ethical guidelines for animal welfare. *Longissimus thoracis* (LT) samples were excised from the 6th rib, 30 min after slaughtering for Dot-Blot analysis. Instrumental meat colour measurements (24h *post-mortem*) for lightness (L^*), redness (a^*) and yellowness (b^*) were recorded directly on the muscle tissue using a Minolta Chroma meter (model CR-300), equipped with a 0° viewing angle. Freshly cut 2.5 cm thick slices of muscle overwrapped on a polystyrene tray were used. Before measurement, the samples were refrigerated (1°C) for at least 1h. The Chroma meter was regularly calibrated using its standard white calibration tile ($Y = 93.58$, $x = 0.3150$, $y = 0.3217$). Three replicate measurements were taken and an average value was used for analysis. For Dot-Blot, samples were immediately frozen in liquid nitrogen following sampling and stored at -80°C until protein extraction. Total protein extractions were performed according to the protocol of Bouley *et al.* [5]. The abundance of 18 proteins [3] was quantified by Dot-Blot according to Guillemain *et al.* [6] using specific antibodies and expressed as arbitrary units. Three other biomarkers corresponded to myosin heavy chains were determined according to Picard *et al.* [7] using an adequate SDS-PAGE and expressed in percentage (%). For subsequent statistical analyses except descriptive statistics, all data were standardized for replicate using the Proc Standard of SAS 9.2 to obtain Z-scores. Multiple regression analyses were carried out using colour parameters as dependent variables and the 21 protein biomarkers as independent variables following the procedure recently described by [3]. Pearson correlation coefficients were generated from the Proc Corr of SAS. PCA analyses for each colour parameter were carried out using all significant correlated variables.

III. RESULTS AND DISCUSSION

Mean and standard deviations of colour parameters, and protein biomarkers abundances are displayed in Table 1. Although no information was available in the literature for Blonde d'Aquitaine meat colour, mean values of L^* a^* b^* were within the range of values reported for LT muscles from young bulls of breeds producing relatively light meat [8]. The three colour parameters were not correlated ($r < 0.29$). L^* a^* b^* values were correlated with various biomarker abundances ($P < 0.05$) and these were introduced in the PCAs (Fig. 1a – c). Hsp70-1A/B and μ -calpain were correlated with the three colour traits: negatively with L^* and positively with a^* and b^* . Seven common correlations were found for L^* and b^* : they were correlated with α B-crystallin, Hsp70-1A/B, Hsp70-8, MyHC-I, μ -calpain, Enolase 3 and MyBP-H (Fig. 1a and c), although directions differed. Hsp40 was positively correlated with both a^* and b^* . Actin (negatively) and MyHC-IIa (positively) were correlated with L^* only. Prdx6 and MDH1 were positively correlated with a^* only. Recent proteomic studies on the colour of pork, beef and fish found relationships with proteins involved in muscle contraction, metabolism, heat stress, signalling and other functions [9-12]. The present study used proteins related to beef tenderness and other sensory meat qualities [1-3]. Few reports exist on the relationships between beef colour and other meat quality biomarkers. Many of the proteins identified in other studies have similar biological functions to those used in our study. In agreement with our findings, negative correlations between α -actin and α B-crystallin were found with L^* in pork [13]. Kwasiborski *et al.* [14] found similarly a negative correlation between a Hsp70 isoform (Hsp72 or Hsp70-1A/B) and L^* in pig LT muscle. Zhang *et al.* [15] reported opposite relationships between Hsp90 and L^* and b^* values but not with a^* in pig muscle. Hsp70s are a class of molecular chaperones implicated in the protection of cells from harmful aggregations of denatured proteins during and following various insults such as heat, ischemia and oxidative stress [16]. Hsp70-1A/B, Hsp70-8 and μ -calpain were negatively correlated with Enolase 3, a glycolytic enzyme described as a hypoxic stress protein providing protection of cells by increasing anaerobic metabolism [17]. Enolase 3 and MyBP-H were closely associated and positively correlated with L^* and negatively with b^* (Fig. 1a and c). Glycolytic enzymes (e.g., phosphoglucose mutase-1,

Table 1. Mean and standard deviation of colour parameters and protein biomarkers abundances of *Longissimus thoracis* muscle of French Blonde d'Aquitaine young bulls.

Variables	Mean	S.D.
Colour		
Lightness (L^*)	36.90	3.24
Redness (a^*)	12.23	1.67
Yellowness (b^*)	15.67	2.57
Protein biomarkers abundances (arbitrary units or %)		
<i>Heat shock proteins</i>		
Hsp27	19.04	5.33
Hsp20	17.39	3.55
α B-crystallin	15.61	4.23
Hsp40	17.40	2.47
Hsp70-1A/B	17.40	3.10
Hsp70-8	17.85	1.64
Hsp-Grp75	17.16	1.90
<i>Metabolism</i>		
Enolase 3	14.51	5.28
LDHB: Lactate dehydrogenase chain B	19.69	3.89
MDH1: Malate dehydrogenase 1	15.71	3.67
<i>Oxidative resistance</i>		
DJ-1: Parkinson disease protein 7	16.13	2.78
Prdx-6: Cis-peroxiredoxin	13.69	1.34
SOD1: Superoxide dismutase Cu/Zn	16.26	1.36
<i>Proteolysis</i>		
μ -calpain	16.50	1.99
<i>Structure</i>		
MyBP-H: Myosin Binding protein H	15.18	2.94
CapZ- β : F-actin-capping protein subunit β	15.90	2.33
Actin	19.45	3.58
MyLC-1F: Myosin Light chain 1F	15.74	1.47
MyHC-I: Myosin Heavy chain-I (%)	19.21	3.65
MyHC-IIA: Myosin Heavy chain-IIa (%)	23.85	4.34
MyHC-IIx/b: Myosin Heavy chain-IIx/b (%)	56.94	3.98

GAPDH, β -enolase ...etc.) were earlier found to be positively correlated with a^* values in beef [10, 11]. The glycolytic pathway allows the production of NADH which is an important co-factor influencing metmyoglobin formation [18]. Prdx6 (Fig. 1b), correlated with a^* and MDH1, is a bifunctional protein with both glutathione peroxidase and phospholipase A₂ (PLA₂) activities. Prdx6 is further related to apoptosis. This pathway involves phosphatidylserine externalisation (flip-flop mechanism) and phosphatidylcholine internalisation, one of the hallmarks of the onset of apoptosis in *postmortem* muscle. Phosphatidylcholine is a key substrate of PLA₂ and able to neutralise the protons generated by glycolysis. This may explain the strong relationship ($r = 0.50$; $P < 0.01$) between Prdx6 and MDH1, an enzyme using NADP⁺ as a cofactor observed in the present study. MDH1 plays pivotal roles in the malate-aspartate shuttle operating

between cytosol and mitochondria. This enzyme is also involved in gluconeogenesis.

In the present study, inducible Hsp70-1A/B and Hsp70-8 were negatively and positively correlated with L^* and b^* , respectively. In accordance, Joseph *et al.* [10] identified three overabundant chaperone proteins related to beef meat colour stability, amongst which a Hsp-1B of 70 kDa. In the present study, Hsp70-1A/B and Hsp70-8 were further positively correlated with μ -calpain ($r = 0.69$ and 0.58 ; $P < 0.01$). The latter three proteins were also positively correlated (r between 0.61 and 0.75 , $P < 0.01$) with MyHC-I (slow oxidative fibres) known to be associated with high levels of Hsp72 [19].

Inducible Hsp70s and μ -calpain may influence meat colour interactively. First, *post-mortem*, reactive oxygen species (ROS) damage the endoplasmic reticulum (ER) of the cells liberating Ca^{2+} , which activates in turn, μ -calpain. Structural proteins are a major substrate of μ -calpain and their characteristics influence meat colour aspects. Second, inducible Hsp70s may limit in this process. Oxidative stress induced by a product of lipid peroxidation, 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), a α,β -unsaturated aldehyde, causes carbonylation of Hsp70 [20], thus inactivating it. It was recently reported that in monkey hippocampal CA1 neurons, carbonylated Hsp70s are key substrates of μ -calpain [21]. If this pathway exists also in muscle, this forms of inducible Hsp70, rather than structural proteins, may be hydrolysed by μ -calpain [21, 22]. 4-HNE may further contribute to the phenomenon as it may cause disruption of Ca^{2+} homeostasis, membrane and structure damage, and cell death [23]. In support of this hypothesis, 4-HNE was reported to affect meat colour by formation of several adducts with muscle proteins, thus modifying protein functionality [24].

Table 3. Prediction equations (best explanatory models) of colour parameters of *Longissimus thoracis* muscle of Blonde d'Aquitaine young bulls using protein biomarkers.

Dependent variable	Adj-R ²	Entered independent variable ¹	Partial R ²	Regression coefficient	P-value
Lightness (L^*)	0.65***	Enolase 3	0.48	+1.05	0.0001
		Hsp70-Grp75	0.17	-0.51	0.008
Redness (a^*)	0.62**	Hsp40	0.33	+1.22	0.0001
		SOD1	0.12	-0.56	0.004
		Hsp70-8	0.17	-0.57	0.013
Yellowness (b^*)	0.47**	μ -calpain	0.23	+0.64	0.001
		Hsp70-Grp75	0.24	-0.48	0.009

¹ Variables are shown in order of their entrance in the prediction models. Significance of the models: ** < 0.01; *** < 0.001.

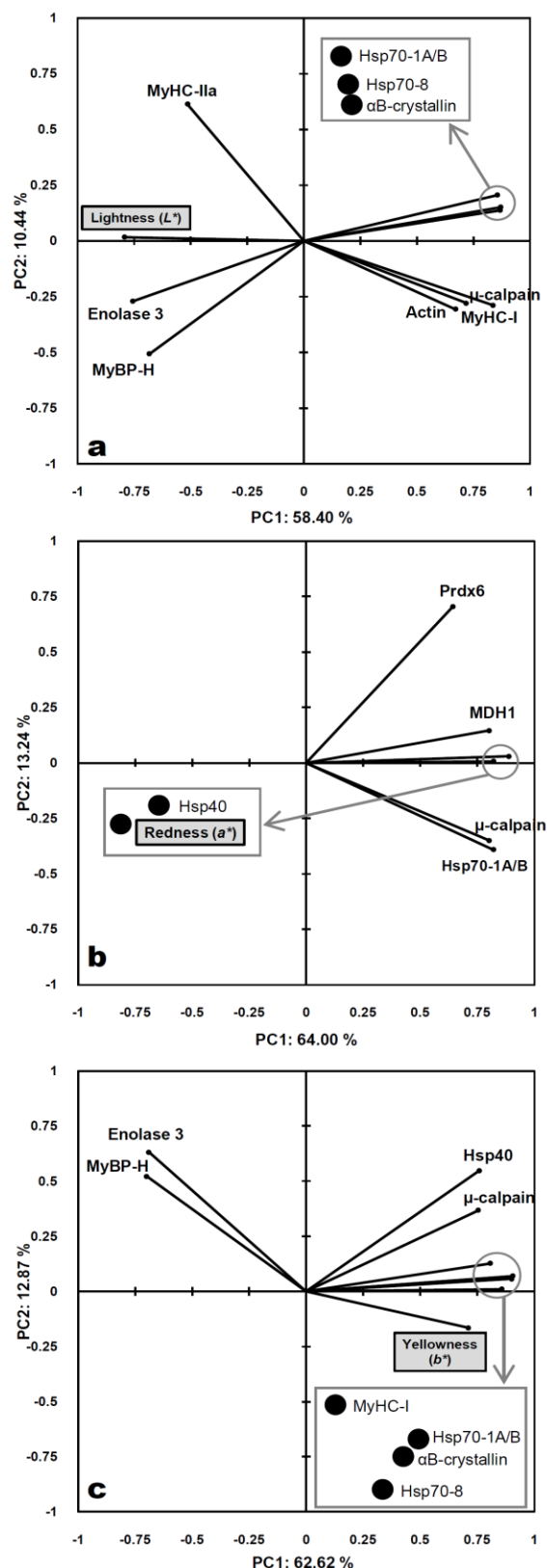


Figure 1. Principal component analysis (PCA) of meat colour traits. **a)** PCA of Lightness (L^*); **b)** PCA of redness (a^*); **c)** PCA of yellowness (b^*) using only the significantly ($P < 0.05$) correlated biomarkers.

These results suggest also that the presence of slow twitch oxidative fibres (type I) has a relatively strong impact on meat colour. First, they contain many mitochondria which generate ROS under hypoxic conditions. In addition, they contain high levels of MyHC-I, inducible Hsp70 and myoglobin, all potential substrates for proteolysis and structural modifications. In conclusion, the interaction between inducible Hsps and μ -calpain may defer changes in the structure of pigment and myofibrillar proteins, influencing aspects of meat colour.

The regression models of the $L^* a^* b^*$ are presented in Table 2. The models were significant ($P < 0.01$) and explained between 47 and 65 % of the variability. The models differed according to colour trait, but all show that Hsp proteins play an important role. The models for L^* and b^* included further Enolase 3 and μ -calpain, respectively. Redness (a^*), considered as indicator of meat discoloration, was further related to SOD1 (involved in detoxification of ROS reported to affect meat colour).

IV. CONCLUSION

The present results show that research using proteomics may help to understand the biological mechanisms involved in beef colour development and stability. Colour traits appear to be related to biological pathways that are also involved in tenderness of beef. Hsp70-1A/B, recently described as a good predictor of meat tenderness [3], may thus also play a central role in meat colour traits. Protein biomarkers may be used to predict meat colour and to elucidate the biochemical mechanisms involved.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was part of the EU FP6 Integrated Project ProSafeBeef, contract no. FOODCT-2006-36241. Funding by the European Union is gratefully acknowledged. We thank INRA UERT (Theix) for animal management and slaughter. A grant of the PROFAS B+ program given to M.G. is also gratefully acknowledged.

REFERENCES

[1] N. Guillemin, M. Bonnet, C. Jurie, B. Picard, J Proteomics, 75 (2011) 352-365.
 [2] M. Gagaoua, D. Durand, D. Micol, V. Santé-Lhoutellier, C. Terlouw, M.P. Ellies-Oury, A. Boudjellal, J.F. Hocquette, B. Picard, in: 15^{èmes} JSMTV, Viandes & Produits Carnés, Clermont-Ferrand, 2014, pp. 137-138.
 [3] B. Picard, M. Gagaoua, D. Micol, I. Cassar-Malek, J.F. Hocquette, C.E. Terlouw, J Agric Food Chem, 62 (2014) 9808-9818.

[4] V. Muchenje, K. Dzama, M. Chimonyo, P.E. Strydom, A. Hugo, J.G. Raats, Food Chemistry, 112 (2009) 279-289.
 [5] J. Bouley, C. Chambon, B. Picard, Proteomics, 4 (2004) 1811-1824.
 [6] N. Guillemin, B. Meunier, C. Jurie, I. Cassar-Malek, J.F. Hocquette, H. Leveziel, B. Picard, J Physiol Pharmacol, 60 Suppl 3 (2009) 91-97.
 [7] B. Picard, C. Barboiron, D. Chadeyron, C. Jurie, Electrophoresis, 32 (2011) 1804-1806.
 [8] M. Gil, X. Serra, M. Gispert, M. Angels Oliver, C. Sanudo, B. Panea, J.L. Olleta, M. Campo, M. Olivan, K. Osoro, M.D. Garcia-Cachan, R. Cruz-Sagredo, M. Izquierdo, M. Espejo, M. Martin, J. Piedrafit, Meat Sci, 58 (2001) 181-188.
 [9] T. Sayd, M. Morzel, C. Chambon, M. Franck, P. Figwer, C. Larzul, P. Le Roy, G. Monin, P. Cherel, E. Laville, J Agric Food Chem, 54 (2006) 2732-2737.
 [10] P. Joseph, S.P. Suman, G. Rentfrow, S. Li, C.M. Beach, J Agric Food Chem, 60 (2012) 3196-3203.
 [11] A.C.V.C.S. Canto, S.P. Suman, M.N. Nair, S. Li, G. Rentfrow, C.M. Beach, T.J.P. Silva, T.L. Wheeler, S.D. Shackelford, A. Grayson, R.O. McKeith, D.A. King, Meat Science, 102 (2015) 90-98.
 [12] M.A. Desai, P. Joseph, S.P. Suman, J.L. Silva, T. Kim, M.W. Schilling, LWT - Food Science and Technology, 57 (2014) 141-148.
 [13] I.H. Hwang, B.Y. Park, J.H. Kim, S.H. Cho, J.M. Lee, Meat Sci, 69 (2005) 79-91.
 [14] A. Kwasiborski, T. Sayd, C. Chambon, V. Sante-Lhoutellier, D. Rocha, C. Terlouw, Meat Sci, 80 (2008) 982-996.
 [15] M. Zhang, D. Wang, Z. Geng, H. Bian, F. Liu, Y. Zhu, W. Xu, Food Chemistry, 165 (2014) 337-341.
 [16] M.P. Mayer, Trends Biochem Sci, 38 (2013) 507-514.
 [17] V. Pancholi, CMLS, Cell. Mol. Life Sci., 58 (2001) 902-920.
 [18] M. Renner, R. Labas, Meat Science, 19 (1987) 151-165.
 [19] A.R. Tupling, E. Bombardier, R.D. Stewart, C. Vigna, A.E. Aqai, Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985), 103 (2007) 2105-2111.
 [20] D.L. Carbone, J.A. Doorn, Z. Kiebler, B.P. Sampey, D.R. Petersen, Chem Res Toxicol, 17 (2004) 1459-1467.
 [21] S. Sahara, T. Yamashima, Biochemical and biophysical research communications, 393 (2010) 806-811.
 [22] E. Nakajima, L.L. David, C. Bystrom, T.R. Shearer, M. Azuma, Investigative ophthalmology & visual science, 47 (2006) 5469-5475.
 [23] H. Esterbauer, R.J. Schaur, H. Zollner, Free Radical Biology and Medicine, 11 (1991) 81-128.
 [24] S.P. Suman, C. Faustman, S.L. Stamer, D.C. Liebler, J Agric Food Chem, 54 (2006) 3402-3408.

Supplément n°02 publication n°04

Supplément 2 publication n° 04

Biomarkers of meat sensory qualities of Angus beef breed: towards the development of prediction equations

« Qualités sensorielles de la viande et stress oxydant en race Angus »

M. Gagaoua, D. Durand, D. Micol, V. Santé-Lhoutellier, E.M.C. Terlouw, M.P. Ellies-Oury, A. Boudjellal, J. F. Hocquette, B. Picard

Publié dans le numéro spécial de Viandes & Produits Carnés, 15^{èmes} JSMTV, pp. 137-8.

Résumé :

L'étape actuelle consiste à valider la liste de biomarqueurs identifiés sur différents types d'animaux et plusieurs muscles de différents niveaux de qualité sensorielle. Cette étude vise à tester la pertinence d'autres variables, tels que des indicateurs de la peroxydation des lipides, de l'oxydation des protéines et du stress oxydant, dans les équations de prédiction des qualités sensorielles de la viande de la race Aberdeen Angus aux muscles de type rouge lent oxydatif. Nous avons présenté dans cette étude les premières équations de prédiction obtenues en incluant d'autres variables supplémentaires que les biomarqueurs. Comme résultats préliminaires, la compilation des biomarqueurs et paramètres indicateurs de différents processus biochimiques nous a permis d'améliorer significativement le pouvoir de prédiction. Pour le cas de la race Aberdeen Angus, les modèles expliquent plus de 60% de la variabilité des attributs sensoriels étudiés, atteignant 75% pour l'appréciation globale. Les équations de prédiction obtenues comprennent des biomarqueurs liés au stress oxydant.

Mots clés : Bovin ; Biomarqueurs ; qualités sensorielles ; peroxydation ; modèles de prédiction ; Angus

QUALITES SENSORIELLES DE LA VIANDE ET STRESS OXYDANT EN RACE ANGUS

GAGAOUA M. (1,3), DURAND D. (1,2), MICOL D. (1,2), SANTE-LHOUTELLIER V. (4), TERLOUW C. (1,2), ELLIES-OURY M.P. (5), BOUDJELLAL A (3), HOCQUETTE J.F. (1,2), PICARD B. (1,2)

(1) INRA, UMR 1213 HERBIVORES, F-63122 SAINT-GENES CHAMPANELLE, FRANCE ; (2) CLERMONT UNIVERSITE, VETAGRO SUP, UMR 1213 HERBIVORES, BP 10448, F-63000 CLERMONT-FERRAND, FRANCE ; (3) EQUIPE MAQUAV, LABORATOIRE BIOQUAL, INATAA, UNIVERSITE CONSTANTINE 1, ROUTE DE AIN EL-BEY, 25000, ALGERIE ; (4) INRA, UR370 QUAPA, 63122 SAINT GENES CHAMPANELLE, FRANCE ; (5) BORDEAUX SCIENCES AGRO, DNSFA, 1 COURS DU GENERAL DE GAULLE, CS 40201, 33 175 GRADIGNAN CEDEX, FRANCE

gmbler2001@yahoo.fr

Abstract: Biomarkers of meat sensory qualities of Angus beef breed: towards the development of prediction equations

The development of accurate biomarkers of meat quality represents an important technological challenge in meat science. This study presents prediction equations of meat sensory qualities using a list of protein markers combined with other indicators of lipid peroxidation, protein oxidation and oxidative stress. The compilation of different biochemical process indicators allowed us to significantly improve the prediction power. For the Angus breed, whose muscles are known to have relatively high levels of oxidative metabolism, models were able to predict over 60% of the variability of the sensory attributes, reaching 75% for overall liking. The prediction equations obtained include biomarkers belonging to the oxidative stress proteins.

Introduction

Depuis le début des années 90, des études scientifiques cherchent à identifier des marqueurs biologiques (ou biomarqueurs) des qualités des viandes qui permettraient la classification des carcasses après abattage en termes de qualités sensorielles. Ce défi suscite un grand intérêt des industriels afin de répondre aux exigences des consommateurs qui attendent une qualité constante et satisfaisante. De nombreuses équipes de recherche ont mené des projets transversaux afin de comprendre les mécanismes sous-jacents impliqués dans le déterminisme des qualités des viandes. Pour atteindre ces objectifs, différentes techniques de génomique, transcriptomique, protéomique,... ont été utilisées pour comparer des groupes de tendreté forte ou faible constitués *a posteriori*. Grâce à cette stratégie, notre équipe a pu identifier une série de biomarqueurs potentiels des qualités sensorielles de la viande bovine, en particulier de la tendreté (Guillemin *et al.*, 2011; Picard *et al.*, 2012; Picard *et al.*, 2013). L'étape actuelle consiste à valider ces biomarqueurs sur différents types d'animaux et plusieurs muscles de différents niveaux de qualité sensorielle. Par exemple, dans le cadre du projet européen « ProSafeBeef » (www.prosafebeef.eu), nous avons récemment validé la relation entre 21 biomarqueurs protéiques et la tendreté de la viande sur trois races différentes par leur précocité : Blonde d'Aquitaine, Limousine et Aberdeen Angus (Picard *et al.*, 2013). Cette étude vise à tester la pertinence d'autres variables, tels que des indicateurs de la peroxydation des lipides, de l'oxydation des protéines et du stress oxydant, dans les équations de prédiction des qualités sensorielles de la viande de la race Aberdeen Angus aux muscles de type rouge lent oxydatif.

Matériel et méthodes

L'expérimentation a porté sur 21 taurillons de race Aberdeen Angus (une race précoce et grasse) en finition à l'Unité expérimentale du Centre de recherche de l'INRA de Theix. Les animaux ont été abattus à un âge moyen de 17 mois. Des échantillons du muscle *Longissimus thoracis* (LT : entrecôte), ont été prélevés au niveau de la 6^{ème} côte de la carcasse 30 minutes (pour le Dot-Blot) ou à 24h après la mort de l'animal (pour les autres analyses). Les échantillons de muscles ont été coupés en petits cubes, immédiatement congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à la quantification des 18 protéines par Dot-Blot (Guillemin *et al.*, 2009). Les protéines analysées sont relatives au stress (α B-Crystalline, Hsp20, Hsp27, Hsp40, Hsp70-1B, Hsp70-8, Hsp70/Grp75), au métabolisme énergétique (Lactate déshydrogénase, Malate déshydrogénase 1, Enolase 3), à la structure du muscle (CapZ- β , α -actine, MyLC-1F, MyBP-H), aux mécanismes de défense contre le stress oxydant (PRDX6, SOD1, PARK7) et à la protéolyse (μ -calpaïne). La proportion des différentes isoformes de chaînes lourdes de myosine (MyHC : *Myosin Heavy Chains*) a été évaluée suivant Picard *et al.* (2011). L'oxydation des protéines a été mesurée par le dosage des carbonyles protéiques après 1 et 14 jours de maturation (Mercier *et al.*, 1998). L'oxydation des lipides a été évaluée avant et après cuisson par la mesure du malondialdéhyde (MDA) (Mercier *et al.*, 1998). L'extraction des lipides totaux a eu lieu à partir d'un broyat de viande suivant la méthode de Folch *et al.* (1957). Puis l'analyse de la composition en acides gras a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse (Gobert *et al.*, 2010). Les contenus en antioxydants de type vitamine E et A ont été déterminés sur la poudre homogène de viande avant et après cuisson par chromatographie en phase liquide à haute performance (Gobert *et al.*, 2010). L'analyse sensorielle a été effectuée par un panel de dégustation (12) en attribuant sur une échelle non structurée (de 0 à 10) une note de : tendreté globale, jutosité, flaveur et appréciation globale pour des morceaux de viande grillés à une température à cœur de 55°C (Gagaoua *et al.*, 2013). Des équations de prédiction des attributs sensoriels mesurés ont été obtenues par régressions multiples pas à pas en utilisant le logiciel XLstat, 2009.

Résultats

Les modèles de prédiction obtenus pour chaque attribut sensoriel sont présentés dans le tableau 1 et illustrés dans la figure 1. Les résultats montrent que la vitamine E après cuisson est retenue comme variable explicative et rentre dans l'ensemble des modèles de prédiction (positivement) excepté celui de la jutosité. Les carbonyles après 14 jours de conservation sont retenus dans l'ensemble des modèles (négativement) excepté celui de la tendreté. Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont impliqués (négativement) dans la prédiction de la jutosité et la tendreté, alors que les lipides totaux ont un lien négatif avec la flaveur. Les protéines liées au stress oxydant sont retenues (négativement) pour la prédiction de la tendreté (PARK7, un senseur de stress oxydatif), de la flaveur et de l'appréciation globale (PRDX6, une enzyme anti-oxydante). Par ailleurs, le MDA, produit terminal majeur de la lipoperoxydation, n'a été retenu que dans la prédiction de la flaveur. L'énolase 3, une isoenzyme de la glycolyse, a une tendance à expliquer une part de la jutosité et de l'appréciation globale.

Discussion

Ces données montrent que les protéines liées à l'oxydation des protéines et des lipides, ou impliquées dans la défense contre le stress oxydant, sont associées aux différentes qualités sensorielles de la viande. Ces résultats peuvent s'expliquer par l'hypothèse que suite à l'exsanguination, la privation en oxygène augmente la production d'espèces radicalaires réactives à l'oxygène (ROS) dans les mitochondries des cellules musculaires (Murphy, 2009). Face à ce stress oxydatif, les cellules vont devoir mobiliser tous les mécanismes de défense cellulaire impliquant leurs protéines anti-oxydantes endogènes, les vitamines et différentes protéines de stress (Hsp) pour piéger les radicaux libérés et réduire leur toxicité afin de restaurer l'homéostasie. Les mécanismes d'implication de ces protéines de défense conduisant aux différentiels de qualité restent à élucider.

Ordre des variables entrant dans le modèle	Tendreté	Jutosité	Flaveur	Appréciation globale
1	– Vitamine A (AC) ***	+ Hsp70-1B ***	– PRDX6 **	– PRDX6 ***
2	+ Vitamine E (AC) ***	– AGPI totaux **	+ MDA (AC) *	– Hsp40 *
3	– AGPI totaux ***	– Carbonyles 14 j *	+ Vitamine E (AC) **	– Carbonyles 14 j ***
4	– PARK7 **	– Hsp70/Grp75 *	– Carbonyles 14 j **	+ Vitamine E (AC) ***
5	– MyHC-IIa *	– Enolase 3 ¹	– Lipides totaux *	– Enolase 3 ¹
6	/	/	/	+ Hsp70-1B *
<i>P-values</i> du modèle	0,002	0,001	0,002	0,000

Signification : t : $P < 0,1$; * : $P < 0,05$; ** : $P < 0,01$; *** : $P < 0,001$.

Abréviations : Prdx6 : Peroxiredoxin 6 ; Hsp : Heat Shock Proteins (protéines de stress thermique) ; MDA : Malondialdéhyde ; PARK7 : Parkinson disease protein 7 ; MyHC : Myosin Heavy Chain (myosines à chaînes lourdes) ; AGPI : Acides gras Polyinsaturés ; AC : après cuisson.

Tableau 1. Modèles de prédiction des qualités sensorielles de la viande bovine de la race Aberdeen Angus.

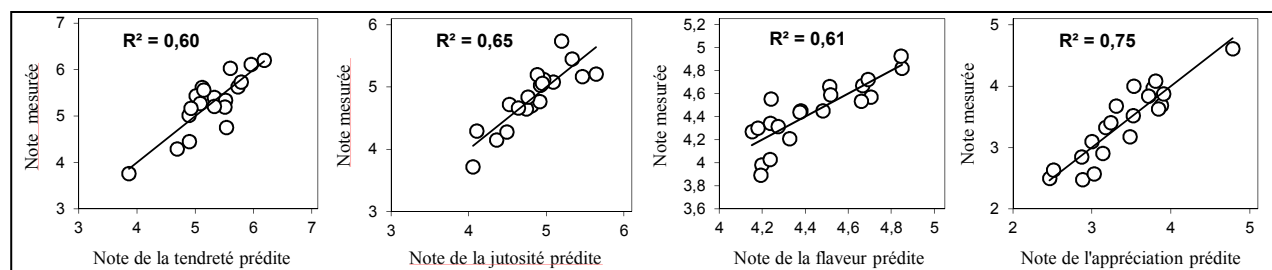


Figure 1. Corrélations entre les attributs sensoriels prédits par les modèles (abscisses) et les attributs mesurés (ordonnés) dans les échantillons du muscle LT de la race Aberdeen Angus.

Conclusions

Ce travail montre que la combinaison des biomarqueurs de tendreté et des indicateurs de peroxydation, d'oxydation des protéines et des lipides, arrive à prédire les principales qualités sensorielles de la viande de la race Angus à plus de 60% et allant à 75% pour l'appréciation globale. Nous confirmons ainsi le rôle important de certaines protéines et leur pertinence dans l'utilisation à terme dans un test pratique. La contribution de ces nouvelles variables au déterminisme des qualités des viandes d'autres races aux muscles de type plutôt glycolytique reste à étudier. Des investigations détaillées permettront de mieux comprendre le rôle des mitochondries, qui sont le siège de la génération des radicaux libres dans la mise en place des qualités des viandes. Enfin, une validation croisée est en cours sur plusieurs types d'animaux et avec des effectifs plus importants.

Références

- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H., 1957. *J Biol Chem* 226, 497-509.
- Gagaoua, M., Micol, D., Richardson, et al. 2013. Proceedings of the 59th ICOMST, Izmir, Turkey, p. 4.
- Gobert, M., et al. 2010. *Meat Science* 85, 676-683.
- Guillemin, N., Bonnet, M., Jurie, C., Picard, B., 2011. *J Proteomics* 75, 352-365.
- Guillemin, N., Meunier, B., Jurie, C., Cassar-Malek, I., Hocquette, J.F., Leveziel, H., Picard, B., 2009. *J Physiol Pharmacol* 3, 91-97.
- Mercier, Y., Gatellier, P., Viau, M., Remignon, H., Renner, M., 1998. *Meat Sci* 48, 301-318.
- Murphy M.P. (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417, 1-13.
- Picard, B., Barboiron, C., Chadeyron, D., Jurie, C., 2011. *Electrophoresis* 32, 1804-1806.
- Picard, B., Gagaoua, M., Kammoun, M., et al., 2013. Proceedings of the 59th ICOMST, Izmir, Turkey, p. 4.
- Picard, B., Lefevre, F., Lebret, B., 2012. *Animal Frontiers* 2, 18-25.

**Biomarqueurs et mécanismes
biologiques impliqués
Apport de l'interactomique**

Introduction

Ces dernières années, il y a eu un engouement croissant concernant la relation entre les protéines et leurs gènes apparentés, avec les paramètres de la qualité de la viande. La protéomique fonctionnelle a pour objectif, de dévoiler l'identité et les fonctions biologiques des protéines en combinant les stratégies électrophorétiques et de séquençage à haut débit. Ces stratégies peuvent être utilisées pour rechercher et identifier des biomarqueurs, qui permettraient de prédire précocement les qualités sensorielles de la viande, telle que la tendreté (Jia *et al.*, 2009; Te Pas *et al.*, 2011; Polati *et al.*, 2012; Ouali *et al.*, 2013; Gagaoua *et al.*, 2014; Picard *et al.*, 2014; Pierzchala *et al.*, 2014; Gagaoua *et al.*, 2015a; Gagaoua *et al.*, 2015b). Les biomarqueurs sont des indicateurs quantifiables des processus biologiques et peuvent jouer un rôle prépondérant pour une meilleure compréhension des processus biochimiques liés à la transformation du muscle en viande et la mise en place de ses différentes qualités (Picard *et al.*, 2010; Te Pas *et al.*, 2011). Une meilleure connaissance et compréhension de la conversion du muscle en viande permettra i) d'évaluer la qualité sensorielle des produits animaux, ii) de faciliter la mise en place des processus de sélection génétique, iii), d'aider à évaluer le potentiel de la qualité sensorielle des viandes bouchères, et iv) d'orienter les systèmes d'élevage et de sélection pour garantir des viandes aux qualités escomptées.

Actuellement, il existe une très large liste de protéines liées à divers aspects de la qualité de la viande. Les nombreuses études conduites par le passé ont montré une certaine cohérence, concernant les protéines identifiées, notamment les voies biologiques impliquées lors de l'acquisition des différentes qualités de la viande. En général, les protéines identifiées et impliquées dans cette mise en place de la qualité sont associées à des fonctions biologiques diverses telles que : la protection contre le stress, le métabolisme énergétique, l'activité mitochondriale et l'apoptose, la protéolyse, et aussi des protéines de structure (Ouali *et al.*, 2013). Toutefois, l'impact et le rôle que ces voies biologiques peuvent jouer dans le développement de la qualité de la viande diffèrent considérablement entre les études et même entre les races et muscles étudiés (Picard *et al.*, 2014). De même, bien que ces études montrent des associations similaires ou différentes, les protéines présentant de fortes corrélations sont souvent différentes. Ces divergences peuvent être expliquées en partie par les différences dans les caractéristiques zootechniques des animaux étudiés (Gagaoua *et al.*, 2015c ; Bourguet *et al.*, 2015). Des recherches plus poussées concernant les protéines impliquées dans des voies biologiques similaires ou non sont nécessaires afin de pouvoir espérer une meilleure maîtrise de l'acquisition des qualités de la viande. L'étape suivante serait donc d'identifier des protéines aux relations robustes, et ce, indépendamment de leur environnement physico-chimique.

Le but de la présente étude, était d'identifier des corrélations robustes entre une liste de biomarqueurs préalablement validée chez d'autres races bovines ou dans différents muscles et de discuter les voies biologiques sous-jacentes. Dans ce contexte, nous avons évalué les abondances des protéines de choc thermique (Hsp), et des protéines impliquées dans le métabolisme énergétique, la structure, la résistance oxydative et la protéolyse dans deux muscles (*Longissimus thoracis* et *Semitendinosus*) de 3 races continentales à viande (Aberdeen Angus, la Blonde d'Aquitaine et la Limousine) du projet ProSafeBeef (www.prosafebeef.eu).

Coherent correlation networks among protein biomarkers of beef tenderness: what they reveal

M. Gagaoua, E.M.C. Terlouw, A. Boudjellal, B. Picard

Publié dans Journal of Proteomics (2015) 128, 365 – 374

Résumé :

Le développement de biomarqueurs prédictifs de la tendreté de la viande est un vrai défi pour la filière bovine. Néanmoins, avant leur utilisation, ces biomarqueurs, doivent être validés et largement documentés. La présente étude vise, en étudiant les muscles *Longissimus thoracis* (entrecôte) et *Semitendinosus* (rond de gîte) de trois races continentales de jeunes taurillons, à i) identifier à partir d'une liste de biomarqueurs, les voies métaboliques susceptibles d'être liées de manière robuste à la tendreté de la viande, et ii) révéler les mécanismes biochimiques sous-jacents de la transformation du muscle en viande. Les interactomes construits dans cette étude à partir de corrélations robustes, ont révélé des relations significatives entre les biomarqueurs de la tendreté de la viande. Pour les deux muscles des trois races, les protéines DJ-1 et Peroxiredoxin 6, ont été trouvées corrélées avec Hsp20 et μ -calpaïne, respectivement. Pour les trois races et dans le muscle LT, la μ -calpaïne a été trouvée liée à la protéine de stress, Hsp70-8. Diverses corrélations étaient muscle-spécifiques. Pour les trois races, la protéine DJ-1 était corrélée avec Hsp27 dans le muscle *Semitendinosus* (ST), et avec ENO3 et LDH-B dans le muscle *Longissimus thoracis* (LT). Globalement, dans le muscle LT, de nombreuses corrélations ont été trouvées avec les protéines liées au métabolisme glycolytique et dans le muscle ST, avec les petites protéines de stress, à savoir Hsp20, 27 et α B-cristalline. La chaperonne Grp75, appartenant à la famille des Hsp70, semble jouer un rôle clé, vu son implication dans plusieurs voies métaboliques. Au niveau scientifique, ces résultats révèlent les différents mécanismes biologiques potentiellement impliqués dans le processus de transformation du muscle en viande. D'autres études sont nécessaires pour confirmer la stratégie d'exploitation de ces biomarqueurs aux relations robustes par la filière viande afin de pouvoir superviser et assurer une bonne qualité bouchère de la viande bovine.

Mots clés : Biomarqueurs ; Bœuf; muscle ; race ; tendreté de la viande ; Interactomes de corrélation.



Coherent correlation networks among protein biomarkers of beef tenderness: What they reveal



Mohammed Gagaoua^{a,b,c}, E.M. Claudia Terlouw^{a,b}, Abdelghani Boudjellal^c, Brigitte Picard^{a,b,*}

^a INRA, UMR 1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

^b Clermont Université, VetAgro Sup, UMR 1213 Herbivores, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

^c Equipe Maquav, INATAA, Université Frères Mentouri Constantine, Route de Ain El-Bey, 25000, Constantine, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 July 2015

Received in revised form 19 August 2015

Accepted 27 August 2015

Available online 3 September 2015

Keywords:

Biomarkers

Beef

Muscle

Breed

Meat tenderness

Correlation networks

ABSTRACT

The development of proteomic biomarkers for meat tenderness remains an important challenge. The present study used *Longissimus thoracis* (LT) and *Semitendinosus* (ST) muscles of young bulls of three continental breeds (Aberdeen Angus, Blond d'Aquitaine and Limousin) to i) identify cellular pathways robustly related with meat tenderness, using potential protein biomarkers and ii) describe biochemical mechanisms underlying muscle to meat conversion. Correlation networks reveal robust correlations, i.e. present for at least two breeds, between potential meat tenderness biomarkers. For the two muscles of the three breeds, DJ-1 and Peroxiredoxin 6 were consistently correlated with Hsp20 and μ -calpain, respectively. For the three breeds, μ -calpain was related to Hsp70-8 in the LT muscle. Various correlations were muscle specific. For the three breeds, DJ-1 was correlated with Hsp27 for the ST, and with ENO3 and LDH-B for the LT muscle. Overall, in the LT, more correlations were found between proteins related to the glycolytic pathway and in the ST, with the small Hsps (Hsp20, 27 and α B-crystallin). Hsp70-Grp75 appeared involved in several relevant biological pathways. At the scientific level, results give insights in biological functions involved in meat tenderness. Further studies are needed to confirm the possible use of these biomarkers in the meat industry to improve assurance of good meat qualities.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In recent years, there has been a growing interest in the relationship between proteins and related genes, and meat quality traits. Functional proteomics aim to elucidate the biological function of proteins combining electrophoretic and protein sequencing technologies. They may be used to identify molecular markers, or biomarkers, that predict meat sensory qualities, including tenderness [1–9]. Such biomarkers are quantifiable indicators of biological processes and may help increasing our understanding of the biochemical processes related to various meat qualities [6,10]. Better knowledge of muscle to meat conversion would i) facilitate genetic selection, ii), help to evaluate the potential sensory quality of future meat products of existing animals, and iii) orient rearing systems and genetic choice to obtain desired meat qualities.

Today, a substantial amount of data exists on proteins that are related to various meat quality aspects. Studies show good coherence in the biological pathways involved in the development of meat quality. Generally, the proteins involved in meat quality are related to protective

functions, glycolytic metabolism, mitochondrial activity and apoptosis, proteolysis, and cell structure [2]. However, the relative impacts of these biological pathways on meat quality development differ considerably between studies and even between breeds and muscles [3]. Similarly, although these studies find associations between proteins of similar or different biochemical pathways, the exact proteins that are correlated often differ. These differences may be explained by differences in the physical and physiological characteristics of the animals studied [11]. We need to get further insight in the functioning of proteins of similar and different biological pathways and ultimately, their relationship with meat quality development. One step would be to identify proteins showing robust correlations, that is, proteins that are correlated irrespectively of their physiological or physical environment.

The aim of the present study was to identify correlations between proteomic markers, existing in more than one breed or muscle and to discuss the underlying biological pathways. Therefore, we evaluated levels of Heat shock proteins (Hsps), and proteins involved in metabolism, structure, oxidative resistance and proteolysis in two muscles (*Longissimus thoracis* and *Semitendinosus*) of three continental beef breeds (Aberdeen Angus, Blond d'Aquitaine, and Limousin). These breeds differ in leanness and earliness and the muscles in metabolic and contractile properties. The proteins studied are potential biomarkers of bovine meat tenderness [3,12–14].

* Corresponding author.

E-mail address: brigitte.picard@clermont.inra.fr (B. Picard).

2. Material and methods

2.1. Animals and sample collection

The study was part of the larger European ProSafeBeef project (FOOD-CT-2006-36241) and organised in two replicates (2 consecutive years, during the spring/summer seasons) in a balanced experimental design. It used 71 young bulls: Aberdeen Angus (AA; $n = 21$), Blond d'Aquitaine (BA; $n = 25$) and Limousin (Li; $n = 25$). At 12 months of age, they were subjected to a 105 day finishing period until slaughter. They were housed in 6 m × 6 m straw-bedded pens with 4 animals of a same breed to a pen. Diets consisted of concentrate (75%) and straw (25%). Before slaughter, all animals were food deprived for 24 h to limit the risk of carcass contamination by microbes in the digestive tract during evisceration, but had free access to water. At a live weight around 665 kg, the animals were slaughtered at the experimental abattoir of the INRA Research centre in compliance with the current ethical guidelines for animal welfare. Bulls were directly transported (4.5 ± 0.1 min) in a lorry (3 × 2 m livestock compartment) from the experimental farm to the experimental abattoir situated at 2 km from the rearing building, with 2 bulls of the same home pen per transport to avoid social isolation stress. After unloading, they were slaughtered within 3 min using standard industry procedures and respecting EU regulations. Slaughter procedures from the loading at the farm to bleeding took 10.6 ± 0.1 min. Slaughter took place between 08.00 h and 10.00 h am. Bulls were stunned by penetrative captive bolt prior to exsanguination [15]. The carcasses were not electrically stimulated and they were chilled and stored at 4 °C from 1 h until 24 h *post-mortem*. *Longissimus thoracis* (LT, mixed fast oxido-glycolytic) and *Semitenidinosus* (ST, mixed fast glycolytic) muscle samples were excised 30 min *post-mortem* and frozen in liquid nitrogen before storage at –80 °C until protein extractions for Dot-Blot analysis or Myosin Heavy Chain (MyHC) isoform quantification.

2.2. Extraction of proteins for Dot Blot

Total protein extractions were performed to use subsequently the soluble fractions for Dot-Blot analysis according to Bouley et al. [16]. Briefly, 80 mg of muscle was homogenized in a denaturation/extraction buffer containing 8.3 M urea, 2 M thiourea, 1% DTT and 2% CHAPS. After 30 min of centrifugation at 10,000 g at 8 °C, the supernatant was stored at –20 °C until use. The protein concentrations of the extracts were determined according to the Bradford method [17] using the Bio-Rad Protein Assay. Bovine serum albumin (BSA) at a concentration of 1 mg/mL was used as standard.

2.3. Immunological protein quantification

The abundances of the 18 biomarkers (including intact proteins, their fragments and complexes) listed in Table 1 were quantified by the Dot-Blot technique according to the protocol described by Guillemain et al. [18] using specific antibodies previously validated by western-blot. Briefly, Western blots were used in order to check the specificity of all the antibodies. An antibody was considered specific against the studied protein when only one band at the expected molecular weight was detected by Western blot. Western blots with the 18 primary antibodies show that all the antibodies bound specifically to the bovine protein with the expected theoretical molecular weight.

Proteins evaluated belong to five different biological pathways (Table 1): muscle fibre structure (Actin, MyBP-H, CapZ-β and MyLC-1F); metabolism (ENO3, LDH-B and MDH1); proteolysis (μ-calpain); oxidative resistance (DJ-1, Prdx6 and SOD1); and Heat shock proteins (αB-crystallin, Hsp20, 27, 40, Hsp70-1A/B, 70-8 and 70-Grp75) were determined according to [11,12]. After quantification, a ratio corresponding to small Hsp per Hsp70s was calculated using the following equation: $s/70 = (\text{Hsp20} + \text{Hsp27} + \alpha\text{B-crystallin}) / (\text{Hsp70-1A/B} + \text{Hsp70-8} + \text{Hsp70-Grp75})$.

Table 1

List of the 18 protein biomarkers of beef tenderness investigated using the Dot-Blot technique in this study.

Protein name	Gene	UniProtKB ID
<i>Heat shock proteins</i>		
αB-Crystallin	CRYAB	P02511
Hsp20	HSPB6	O14558
Hsp27	HSPB1	P04792
Hsp40	DNAJA1	P31689
Hsp70-1A/B	HSPA1B	P08107
Hsp70-8	HSPA8	P11142
Hsp70-Grp75	HSPA9	P38646
<i>Metabolism</i>		
ENO3 (enolase 3)	ENO3	P13929
LDH-B (lactate dehydrogenase chain B)	LDHB	P07195
MDH1 (malate dehydrogenase 1)	MDH1	P40925
<i>Structure</i>		
CapZ-β (F-actin-capping protein subunit β)	CAPZB	P47756
α-actin	ACTA1	P68133
MyLC-1F (myosin light chain 1F)	MYL1	P05976
MyBP-H (myosin binding protein H)	MYBPH	Q13203
<i>Oxidative resistance</i>		
DJ-1 (Parkinson disease protein 7)	PARK7	Q99497
Prdx6 (Cis-peroxiredoxin)	PRDX6	P30041
SOD1 (superoxide dismutase Cu/Zn)	SOD1	P00441
<i>Proteolysis</i>		
μ-Calpain	CAPN1	P07384

Compared to Western blot, Dot-Blot is a rapid technique, but with a similar coefficient of variation inter and intra assay (10%). Optimal dilution ratios of the antibodies were determined at the same time, using the conditions indicated by the supplier of the reactant and adapted to bovine muscle samples [11]. Conditions retained and suppliers for all primary antibodies are reported in Table 2. Protein extracts (15 μg) of each of the 142 muscle samples were spotted (four replications per muscle sample) on a nitrocellulose membrane with the Minifold I Dot-Blot apparatus from Schleicher & Schuell Biosciences (Germany) in a random order on the 96-spot membrane. In addition, a mixed standard sample (15 μg) was deposited for data normalization as reported by Guillemain et al. [18]. The Dot-Blot membranes were air-dried for 5 min, blocked in 10% PBS milk buffer at 37 °C for 20 min, and then incubated to be hybridized with the specific primary antibody of each protein (Table 2). Subsequently, the membranes were incubated at 37 °C for 30 min with the anti-mouse fluorochrome-conjugated LICOR-antibody IRDye 800CW (1 mg/mL).

Infrared fluorescence detection was used for quantification of the relative protein abundances. Subsequently, the membranes were scanned using the Odyssey NIR imager (LI-COR Biosciences), with an 800 nm laser, a 169 μm spatial resolution and a fixed gain of 5.

Dot-Blot images were quantified with GenePix PRO v6.0 (Axon) [18]. Each dot volume was calculated as the total dot intensity from which the median local background value multiplied by the dot area was subtracted. Because Dot-Blot offers the possibility of replicates, a data-prefiltering approach was implemented to eliminate outlier values mainly due to dust. The exclusion technique of outliers was based on the Medium Absolute Difference (MAD) and applied before repeated values were averaged. Finally, to make the data comparable between assays, the data were normalized using a regression-approach based on the used mix standard specific for each muscle. Thus, relative protein abundances were based on the normalized volume and expressed in arbitrary units.

2.4. Electrophoresis and quantification of Myosin Heavy Chain (MyHC) isoforms

The abundance of the three other proteins corresponding to MyHC isoforms was quantified by an appropriate SDS-PAGE technique [19].

Table 2

Suppliers and conditions for each primary antibody used in this study.

Target protein	Antibody references	Dilutions ^a
<i>Heat shock proteins</i>		
αB-crystallin	Monoclonal anti-bovine Assay Designs SPA-222	1/500
Hsp20	Monoclonal anti-human Santa Cruz HSP20-11:SC51955	1/200
Hsp27	Monoclonal anti-human Santa Cruz HSP27 (F-4):SC13132	1/3000
Hsp40	Monoclonal anti-human Santa Cruz HSP40-4 (SPM251):SC-56400	1/250
Hsp70-1A/B	Monoclonal anti-human Abnova HSPA1B (M02), clone 3B7	1/2000
Hsp70-8	Monoclonal anti-bovine Santa Cruz HSC70 (BRM22):SC-59572	1/250
Hsp70-Grp75	Monoclonal anti-human RD Systems Clone 419612	1/250
<i>Metabolism</i>		
ENO3	Monoclonal anti-human Abnova Eno3 (M01), clone 5D1	1/45,000
LDH-B	Monoclonal anti-human Novus LDHB NB110-57160	1/50,000
MDH1	Monoclonal anti-pig Rockland 100-601-145	1/1000
<i>Structure</i>		
CapZ-β	Monoclonal anti-human Abnova CAPZB (M03), clone 4H8	1/250
α-Actin	Monoclonal anti-Rabbit Santa Cruz α-actin (5C5):SC-58670	1/1000
MyLC-1F	Polyclonal anti-human Abnova MYL1 (A01)	1/1000
MyBP-H	Monoclonal anti-human Abnova MYBPH (M01), clone 1F11	1/4000
<i>Oxidative resistance</i>		
DJ-1	Polyclonal anti-human Santa Cruz DJ-1 (FL-189):SC-32874	1/250
Prdx6	Monoclonal anti-human Abnova PRDX6 (M01), clone 3A10-2A11	1/500
SOD1	Polyclonal anti-rat Acris SOD1 APO3021PU-N	1/1000
<i>Proteolysis</i>		
μ-Calpain	Monoclonal anti-bovine Alexis μ-calpain 9A4H8D3	1/1000

^a Dilutions of each antibody are as described in Gagaoua et al. [1].

One hundred milligrams of frozen muscle was ground using a Polytron in 5 mL of extraction buffer solution containing 0.5 M NaCl, 20 mM Na Pyrophosphate, 50 mM Tris, 1 mM EDTA and 1 mM Dithiothreitol. The sample was kept 10 min at 4 °C on ice, and then centrifuged for 5 min at 5000 g. Following centrifugation, the supernatant was diluted 1:1 (v/v) with glycerol at 87% and stored at −20 °C until used. The samples were then mixed with an equal volume of loading buffer containing 4% SDS (w/v), 125 mM Tris, pH 6.8, 20% glycerol (v/v), 10% β-mercaptoethanol (v/v) and 0.02% pyronin Y (w/v) incubated at room temperature for 10 min and then heated (70 °C) for 10 min. The proteins were separated by SDS-PAGE electrophoresis according to Picard et al. [19] using 9.2% polyacrylamide gels. The lower running buffer consisted of 50 mM Tris (base), 75 mM glycine and 0.05% w/v SDS. The upper running buffer was at 2× the concentration of the lower running buffer and β-mercaptoethanol (0.07% v/v) was added. Ten micrograms of protein extracts were loaded per well onto 0.75-mm-thick gels mounted on a Mini-Protean II Dual Slab Cell electrophoretic system (Bio-Rad). The migration was carried out at a constant voltage of 70 V for 30 h at 4 °C. After migration, the gels were fixed in 30% (v/v) ethanol and 5% acetic acid (v/v) and then stained with colloidal Coomassie Blue R250 for 24 h. Gels were destained in a 30% ethanol (v/v) and 5% acetic acid (v/v) solution until the background was sufficiently cleared. After staining, the gels were scanned and the proportions of the different MyHC bands were quantified by densitometry with ImageQuant Software 5500 (Amersham Biosciences/GE Healthcare). The quantification of the bands revealed the existence of MyHC-IIb isoform [20] in only some animals (8 animals of 71). Consequently MyHC-IIb percentages were totalled with those of MyHC-IIx creating a new variable “MyHC-IIx + b” (fast glycolytic fibres).

2.5. Statistical analysis and construction of the correlation networks

Raw data from the sensory meat quality biomarkers were analysed using the GLM procedure of SAS (SAS 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) to evaluate effects of breed and replicate and their interactions, all introduced as fixed effects. For subsequent analyses, data were standardized to remove the effects of replicate, by calculating Z-scores using the PROC STANDARD. More precisely, the standard score of a raw score

x was calculated using the following formula: $z = \frac{x - \mu}{\sigma}$ where: μ is the mean of the population of each breed and σ is the standard deviation of the population [11]. Pearson correlation coefficients were calculated using Z-scores using the PROC CORR of SAS. If correlations between two biomarkers were significant ($P < 0.05$) for more than one breed, data of the different breeds were combined to calculate an overall correlation coefficient on Z-scores. Final results are presented as correlation networks which represent all the correlated biomarkers for a given muscle, combining two (BA-Li; BA-AA or AA-Li) or three breeds (AA, BA and Li).

3. Results

Tables 3 and 4 show that nearly all the breed effects found for the biomarkers abundances in the ST were also found in the LT muscle. For both muscles, AA had higher levels of small Hsps, s/70, ENO3, MyHC-I and MyHC-IIa, and lower levels of MyHC-IIx + b and LDH-B compared to the other breeds. BA had higher levels of μ-calpain, and to a lesser extent, Hsp70-8, than the other breeds. Specifically in the LT muscle, breed effects were further found for Hsp70-Grp75, Hsp40, MDH1, CapZ-β, α-actin and MyLC-1F. Specifically, LT Hsp70-Grp75 levels of AA were lower than in Li while BA had highest levels and LT CapZ-β levels were higher in AA compared to Li and BA. DJ-1 had a breed effect only in the ST muscle. Some effects of replicate or breed × replicate interactions were also found. Most of these were minor, with some exceptions. For example, for ST Hsp20 levels, Li breed had the lowest levels during the first and the highest during the second replicate, compared to the other groups (Table 4). Similarly, LT MDH1 levels of AA and Li for the first replicate were lower than those obtained in the other groups (Table 3). In contrast to the LT, in the ST muscle, no breed effects were found for the structural proteins (CapZ-β and α-actin).

The correlation networks based on all breeds showed also a number of similarities between the LT and ST muscles (Fig. 1). For the LT and ST, respectively, 17 and 13 biomarkers were correlated. The correlations were organised in a single network for the LT muscle (Fig. 1A) and two networks for the ST muscle (Fig. 1B). Almost all correlations were positive. Eleven (Hsp20, Hsp27, αB-crystallin, s/70, DJ-1, μ-calpain, Prdx6, MyHC-IIa, MyHC-IIx + b, MyLC-1F and Hsp70-Grp75) of the 13

Table 3Effects of breed, replicate and breed × replicate interaction on beef tenderness biomarkers in the *Longissimus thoracis* muscle.

Variables ¹	Breed ² (B) × replicate ³ (R)						SEM ⁴	P-value ⁵		
	AA1	AA2	BA1	BA2	Li1	Li2		(B)	(R)	B × R
<i>Heat shock proteins</i>										
αB-crystallin	24.4b	29.4a	12.4d	19.0c	16.1d,c	20.3b,c	0.84	***	***	ns
Hsp20	22.3a	17.4b	17.1b	17.8b	19.4a,b	16.8b	0.51	ns	*	t
Hsp27	28.4a	29.1a	18.9b	19.0b	22.0b	20.9b	1.08	***	ns	ns
Hsp40	18.4a	17.6a,b	15.6b	18.3a	16.2b	15.9b	0.26	**	ns	**
Hsp70-1A/B	16.8b	18.7a,b	15.7b	19.4a,b	16.9b	21.3a	0.46	ns	***	ns
Hsp70-8	16.3a,b	15.1b	16.8a,b	18.1a	16.0b	17.0a,b	0.22	**	ns	*
Hsp70-Grp75	9.0c	9.2c	17.0a	16.2a	11.9b	13.2b	0.44	***	ns	ns
s/70 ⁶	1.81a	1.85a	0.98b	1.05b	1.30b	1.13b	0.05	***	ns	ns
<i>Metabolism</i>										
ENO3	17.1	17.9	17.5	12.8	13.9	13.0	0.56	*	ns	ns
LDH-B	10.1c	10.2c	18.9a	19.2a	13.2b,c	14.9b	0.59	***	ns	ns
MDH1	10.5b	14.7a	14.9a	15.8a	10.6b	16.8a	0.45	*	***	*
<i>Structure</i>										
CapZ-β	19.6a	18.9a	14.4b	17.1a,b	15.5b	15.3b	0.42	***	ns	ns
α-Actin	17.9a,b	15.6b	17.9a,b	20.8a	15.3b	17.0b	0.40	***	ns	*
MyLC-1F	15.0a,b	14.8a,b	15.0a,b	15.9a	13.6b	14.8a,b	0.2	*	ns	ns
MyBP-H	13.4	13.0	19.1	11.6	12.8	14.4	0.84	ns	ns	ns
MyHC-I	29.5a	27.1a,b	15.6d	21.8c	23.3c,b	23.9c,b	0.73	***	ns	*
MyHC-IIa	52.2b	57.2a	26.6d	21.8e	32.1c	29.7c,d	1.64	***	ns	*
MyHC-IIx + b	18.3c	15.7c	57.7a	56.3a	44.6b	46.4a	2.13	***	ns	ns
<i>Oxidative resistance</i>										
DJ-1	16.6	17.6	16.0	16.0	15.4	17.6	0.33	ns	ns	ns
Prdx6	15.8a	15.0a,b	13.1c	13.6c	12.5c	14.0c,b	0.22	***	ns	t
SOD1	17.0	18.6	15.7	15.9	15.1	15.9	0.42	ns	ns	ns
<i>Proteolysis</i>										
μ-Calpain	14.4b	13.8b	14.9a,b	16.7a	12.8b	15.0a,b	0.28	**	*	ns

¹ All variables were expressed in arbitrary units except MyHC which were in percentage.² Breed designation: AA: Aberdeen Angus, BA: Blond d'Aquitaine, Li: Limousin.³ Replicate: 1 and 2 for first and second years.⁴ Standard error of the mean.⁵ Significance level: ns: not significant, $t < 0.10$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.⁶ s/70: ratio of small Heat shock proteins to Hsp70s calculated using the following formula: $s/70 = (\text{Hsp20} + \text{Hsp27} + \alpha\text{B-crystallin} / \text{Hsp70-1A/B} + \text{Hsp70-8} + \text{Hsp70-Grp75})$.

biomarkers retained for the ST muscle were also for the LT muscle. For both the LT and ST muscles, correlations were found between Hsp27 and s/70, between Prdx6 and μ-calpain, between Hsp20 and DJ-1 and between MyHC-IIa and MyHC-IIx/b (Fig. 1).

The networks based on common correlations in the BA and Li breeds found 21 and 19 biomarkers, organised in a single network for both LT and ST muscles, respectively (Fig. 2A,B). Of the correlated biomarkers, most of them were found to be shared by the two muscles. First, DJ-1 was correlated with Hsp27, LDH-B and MDH1. Second, Hsp70-8 was correlated with Prdx6, MyLC-1F and Hsp70-1A/B. Last, Hsp70-1A/B was correlated with αB-crystallin.

The networks based on common correlations in the AA and Li breeds found 4 and 8 additional biomarkers with respect to Fig. 1, organised in a single network for the LT and two networks for ST muscles (Fig. 3A,B). Of the retained biomarkers, four (LDH-B, μ-calpain, s/70, and CapZ-β) were common for the LT and ST muscles. Only one correlation was common for both muscles: the one between LDH-B and μ-calpain.

The networks based on common correlations in the AA and BA breeds found 4 and 3 additional biomarkers with respect to Fig. 1, organised in two networks for the LT and ST muscles, respectively (Fig. 3C,D). Of the retained biomarkers, three (Hsp70-1A/B, αB-crystallin and ENO3) were common for both muscles. No common correlation was found between the two muscles.

The networks based on pairs of breeds contained mostly positive correlations, with the exception of five correlations which were negative. Most of the correlation coefficients were between about 0.4 and 0.6 ($P < 0.05$) for both muscles. Among the robust relationships found for the three breeds (AA + BA + Li) and two muscles (LT and ST), the correlation between Peroxiredoxin 6 and μ-calpain ($P < 0.01$) is presented in Fig. 4 as an example.

4. Discussion

The aim of this study was to identify robust relationships between meat quality biomarkers of meat tenderness [2,12,13] using correlation network analyses. A correlation between biomarkers was considered robust if it existed for more than one breed or muscle studied. The interpretation of these consistent correlations may improve our understanding of the underlying biological pathways and interactions in different muscles or breeds.

For the two muscles of the three breeds, DJ-1 was positively correlated with Hsp20. For the three breeds, DJ-1 was further correlated with Hsp27 for the ST and with ENO3 and LDH-B for the LT muscle. For the BA and Li breeds, DJ-1 was correlated with Hsp27, MDH1 and LDH-B of the two muscles. DJ-1 is a highly conserved protein of 189 amino acids present in the cytoplasm as well as in intracellular organelles and protects against oxidative stress [21]. For example, it promotes the expression of a number of mitochondrial enzymes involved in reactive oxygen species (ROS) removal [22]. It was further reported to play an anti-apoptotic role, by the involvement of its anti-oxidant activities. It was reported that a deficiency in DJ-1 leads to increased apoptosis, possibly by decreasing Bax expression (a pro-apoptotic protein regulator) and inhibiting caspase activation [23].

The correlations between DJ-1 and ENO3, LDH-B and MDH1 may be indirectly related to energy metabolism. ENO3 catalyses the conversion of 2-phosphoglycerate to phosphoenolpyruvate, and LDHB catalyses the inter-conversion of pyruvate and lactate with concomitant inter-conversion of NADH and NAD⁺. MDH1 plays a pivotal role in the malate-aspartate shuttle operating between cytosol and mitochondria [24]. MDH1 also uses the reduction of NAD⁺ to NADH to catalyse reversibly the oxidation of malate to oxaloacetate. This NADH may be used in

Table 4Effects of breed, replicate and breed × replicate interaction on beef tenderness biomarkers in the *Semitendinosus* muscle.

Variables ¹	Breed ² (B) × replicate ³ (R)						SEM ⁴	P-value ⁵		
	AA1	AA2	BA1	BA2	Li1	Li2		(B)	(R)	B × R
<i>Heat shock proteins</i>										
αB-crystallin	11.4b	14.8a	5.8c	7.9c	6.9c	8.8c	0.46	***	**	ns
Hsp20	13.9a,b	13.0a,b,c	11.6b,c	13.8a,b	10.7c	15.4a	0.35	ns	**	**
Hsp27	20.2a	20.3a	12.7b	14.4b	12.8b	15.6b	0.60	***	*	ns
Hsp40	14.1	13.4	12.3	13.1	12.9	12.4	0.22	ns	ns	ns
Hsp70-1A/B	11.2b	13.3a,b	12.4a,b	12.9a,b	11.1b	14.3a	0.30	ns	***	ns
Hsp70-8	15.5a,b	14.1b	16.3a	15.8a,b	15.3a,b	16.1a	0.19	*	ns	t
Hsp70-Grp75	13.1	13.5	12.5	12.7	11.1	12.9	0.24	ns	ns	ns
s/70 ⁶	1.15a	1.2a	0.74c	0.87b,c	0.81b,c	0.92b	0.02	***	*	ns
<i>Metabolism</i>										
ENO3	15.2a,b	15.9a	12.8b,c	11.9c	12.4b,c	13.3a,b,c	0.35	***	ns	*
LDH-B	10.6c	12.0b,c	16.0a	14.2a,b	12.6b,c	14.2a,b	0.33	***	ns	ns
MDH1	13.8b,c	17.7a	13.2c	16.6a	12.3c	15.9a,b	0.37	ns	***	ns
<i>Structure</i>										
CapZ-β	14.4	15.5	12.9	13.8	12.9	14.5	0.28	ns	ns	ns
α-Actin	17.5	17.3	17.9	17.0	17.6	18.2	0.31	ns	ns	ns
MyLC-1F	14.9	15.0	15.5	15.9	14.6	15.3	0.18	ns	ns	ns
MyBP-H	13.8	13.9	13.0	12.9	13.1	13.6	0.36	ns	ns	ns
MyHC-I	11.5a	8.6b	6.6b,c	3.8d	8.2b	4.8c,d	0.43	***	***	ns
MyHC-IIa	30.4a	33.0a	20.6c	15.7d	26.1b	21.6c	0.88	***	t	*
MyHC-IIx + b	58.1d,e	58.4e	72.8b,c	80.5a	65.7c,d	73.6a,b	1.30	***	*	**
<i>Oxidative resistance</i>										
DJ-1	13.8b	15.9a	12.9b	13.2b	12.4b	13.4b	0.26	**	*	ns
Prdx6	17.5a	18.0a	15.5b	15.7b	14.0c	16.1b	0.23	***	*	ns
SOD1	16.4	15.4	15.3	15.6	14.5	16.2	1.22	ns	ns	ns
<i>Proteolysis</i>										
μ-Calpain	13.3b,c	14.1a,b,c	14.5a,b,c	15.7a	12.5c	15.4a,b	0.26	*	***	ns

¹ All variables were expressed in arbitrary units except MyHC which were in percentage.² Breed designation: AA: Aberdeen Angus, BA: Blond d'Aquitaine, Li: Limousin.³ Replicate: 1 and 2 for first and second years.⁴ Standard error of the mean.⁵ Significance level: ns: not significant, t $P < 0.1$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.⁶ s/70: ratio of small Heat shock proteins to Hsp70s calculated using the following formula: $s/70 = (\text{Hsp20} + \text{Hsp27} + \alpha\text{B-crystallin} / \text{Hsp70-1A/B} + \text{Hsp70-8} + \text{Hsp70-Grp75})$.

the electron transport chain for ATP production. Thus, high MDH1 content may be indicative of an increase in the oxidative phosphorylation capacity of the muscle due to cell stress.

The associations found between these enzymes and DJ-1 may be related to the production of ROS associated with increased metabolic activity. During oxidative stress, DJ-1 is re-localized to the mitochondria, where it has a key role in scavenging mitochondrial H_2O_2 and limiting mitochondrial fragmentation [25]. MDH1 is involved in the final steps of glycolysis before malate enters the mitochondrion, hence the relationship between DJ-1 and MDH-1 may be relatively direct. The other enzymes, ENO3 and LDH-B are more closely related to the glycolytic pathway and are not directly involved in the production of ROS. Their association with DJ-1 may thus be indirect, as increased levels of these enzymes may express increased energy metabolism, including ROS producing pathways.

The correlations between DJ-1 and Hsp20 were remarkably consistent across muscles and breeds as they included also the AA breed. DJ-1 was further correlated with Hsp27 levels in both muscles of the Li and BA breeds. DJ-1 and these small Hsps were correlated with several other proteins evaluated in this study, mostly involved in glycolysis and oxidative stress. Hsp20 and 27 are simultaneously expressed at high levels in many mammalian tissues including skeletal muscle [26]. Members of the small Hsp family are known to act as molecular chaperones preventing unfolded proteins from aggregation or facilitating refolding of unfolded proteins [27]. Particularly, these small Hsps protect proteins of the cytoskeleton [28]. In addition to these activities, Hsp20 and 27 have the ability to collaborate to control the redox status [29]. The positive correlations between small Hsps and DJ-1 may be explained by increased ROS production. For example, in exercising muscles, increased levels of

Hsp27 were associated with lower TBARS levels, suggesting that these Hsps may lower oxidative stress status [30]. In conclusion, increased ROS production may have induced simultaneously higher levels of DJ-1 and small Hsps.

For the two muscles of the three breeds, μ-calpain was consistently correlated with Prdx6 (Fig. 4). Calpains are a class of proteins that belong to the Ca^{2+} -dependent, non-lysosomal cysteine proteases involved in proteolysis. μ-Calpain requires micromolar concentrations of Ca^{2+} for its activation [31]. Prdx6 is a bifunctional protein with both glutathione peroxidase and phospholipase A2 (PLA2) activities [32]. Prdxs are known as antioxidant enzymes which convert hydrogen peroxide to water. They can be regulated by oxidation, phosphorylation and proteolysis [33]. The positive correlation with μ-calpain may be explained by earlier observations indicating that antioxidant enzymes, such as Prdx6, may protect proteases, including μ-calpain [34]. Other studies reported that phosphorylation is likely to decrease Prdx activity, while proteolysis makes the protein more resistant to inactivation by overoxidation in response to rising levels of peroxide [33].

A second possible mechanism explaining the relationship between Prdx6 and μ-calpain may be related to the PLA2 group of Prdx6. This group is able to hydrolyse phosphatidylcholine, which are basic phospholipids normally present on the outer leaflet of the cell membranes [35]. At the first stages of apoptosis, considered to be central in muscle to meat conversion [36], the phospholipids distribution in the cell membranes is inverted: phosphatidylserine switches to the outer and phosphatidylcholine to the inner leaflet of the membrane by a flip-flop process [36,37]. Inversion of membrane polarity may cause modifications in the membrane fluidity which will become more permeable to

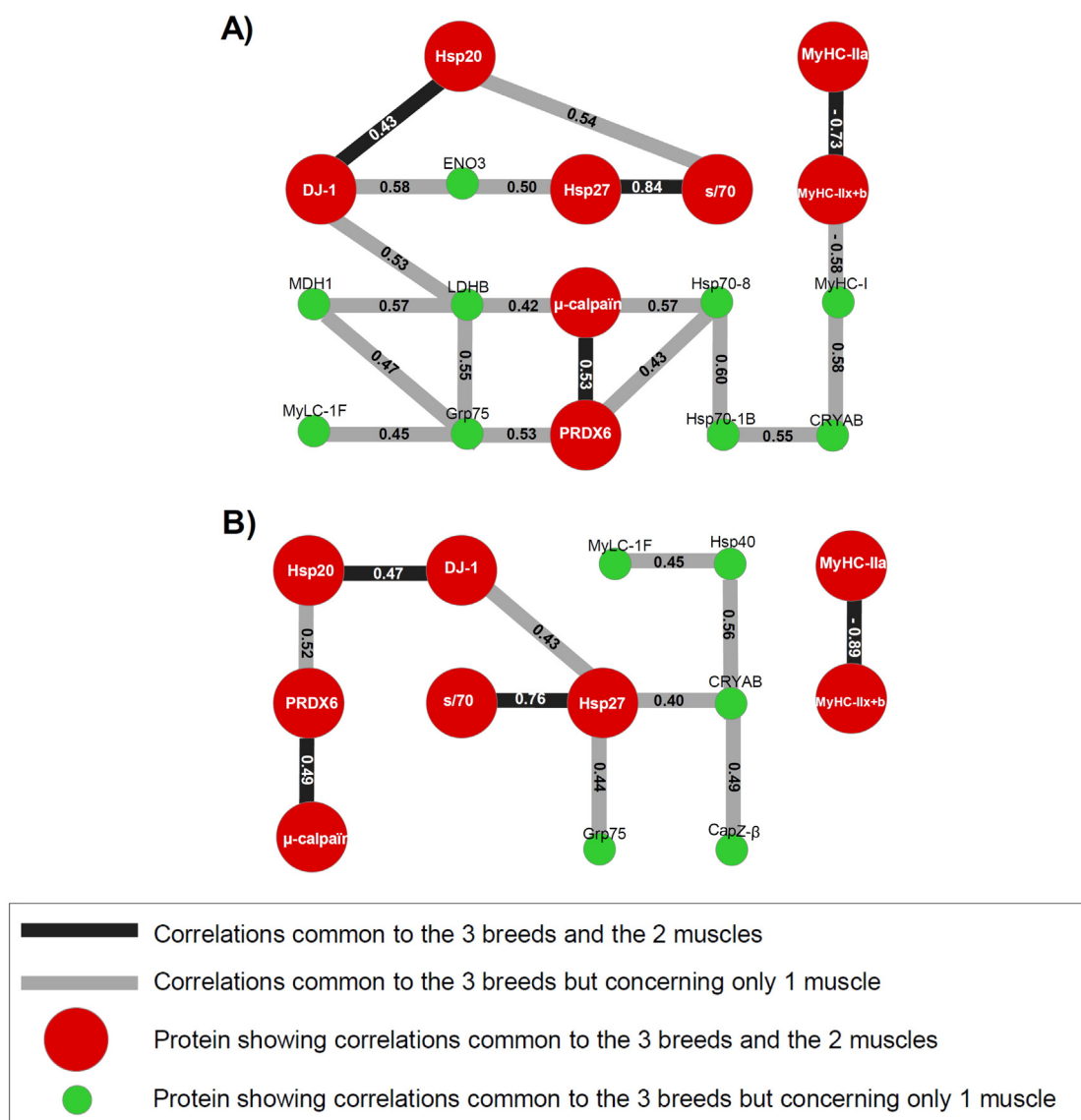


Fig. 1. Correlation networks within all breeds (AA + BA + Li) for *Longissimus thoracis* (A) and *Semitendinosus* muscles (B). The correlation values found using standardized data (Z-scores) are shown on each interaction line. The black edges connecting the red nodes are common for both muscles and three breeds. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

ions such as Ca^{2+} , thereby increasing μ -calpain activity. However, it seems today difficult to take conclusions about the functions of Prdx6 or other antioxidant proteins in *post-mortem* muscle and thus more detailed investigations will be needed in order to clarify the exact nature of the relationship between increased oxidative enzymes activities and ultimate meat quality.

Other robust correlations involve part of the proteins mentioned above and members of the Hsp70 family. μ -Calpain was positively correlated with Hsp70-8 in LT muscle for the three breeds. In addition, μ -calpain was positively correlated with Hsp70-Grp75 and Hsp70-1A/B in the LT muscle of the Li and BA bulls. Hsp70-8 was positively correlated with Prdx6, MyLC-1F and Hsp70-1A/B for both muscles of BA and Li breeds. Hsp70-1A/B was further positively correlated with α B-crystallin.

The Hsp70 kDa family proteins are among the most highly conserved protein families found in a wide array of organisms [38,39]. Hsp proteins are categorized into several families that are named on the basis of their approximate molecular weight. Among the best known and investigated Hsp is the Hsp70 family. They were reported by our group to play an important role in meat tenderness in different

breeds and muscles [2,3,10]. Their functions include folding of nascent polypeptides, protein translocation across membranes, chaperone-mediated autophagy, and prevention of protein aggregation under stress conditions [39]. Hypoxic and ischemic conditions and increased production of ROS induce Hsp70 expression, helping to maintain the mitochondrial membrane potential and ATP levels [39]. Hsp70 proteins are further involved in apoptotic pathways as they sequester pro-apoptotic factors such as Bcl-2 [40]. Hsp70-1A/B is abundantly induced in response to cellular stress, possibly due to its function to preserve proteins [38]. Hsp70-8 is constitutively expressed in most tissues. Hsp70-1A/B and Hsp70-8 are highly related chaperones and are often suggested to have similar physiological functions. They were both reported to collaborate with Hsp40 to ensure a good functioning of the muscle under oxidative stress conditions [38]. This is coherent with results in the present study, showing that both chaperone proteins were correlated with the co-chaperone Hsp40 (*DNAJA1*) in the LT muscle of BA and Li breeds. Like Hsp70-1A/B and Hsp70-8, Hsp40 is related to beef tenderness [41]. An emerging hypothesis is that Hsp40 may decrease apoptosis and, therefore, meat ageing and its tenderization during meat storage.

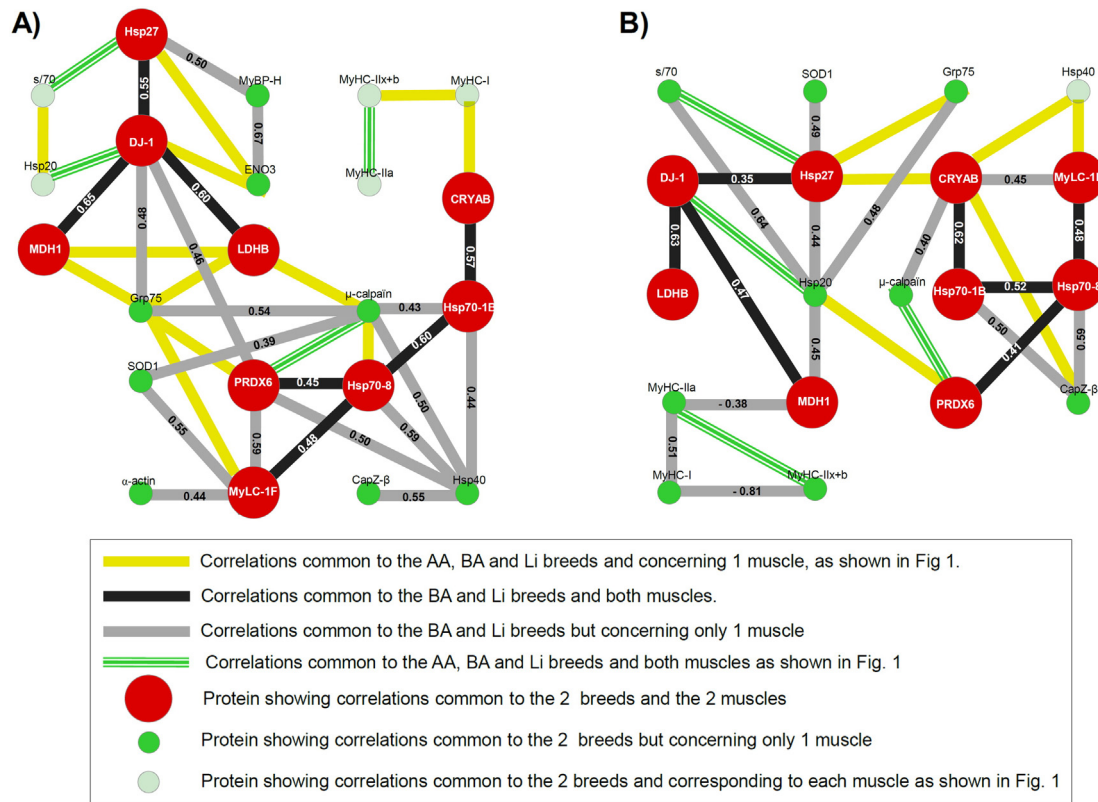


Fig. 2. Correlation networks within breed interactions for BA and Li among *Longissimus thoracis* (A) and *Semitendinosus* (B) muscles. The correlation values found using standardized data (Z-scores) are shown on each new interaction line (black and dark grey edges).

The positive relationship between Prdx6 and Hsp70-8 can also be related to the activity of the PLA2 group of Prdx6. Hsp70-8 binds to membrane phospholipids and interacts with PLA2 activity [42,43] and may thus interfere in reactions between the PLA2 group of Prdx6 and phospholipids.

The association of Hsp70-1A/B with α B-crystallin in the LT muscle of the three breeds and in the ST muscle for BA and Li breeds may be explained by their role in the regulation of apoptosis. Hsp70-1A/B and α B-crystallin were reported to regulate interactively apoptosis by binding members of the apoptotic cascade, thereby slowing the process [44]. The association of Hsp70-1A/B with μ -calpain in the LT muscle agrees with results of other studies [11,45]. This positive relationship may be explained by oxidative stress occurring during the *ante* and *post-mortem* periods, increasing simultaneously levels of Hsp70-1A/B and μ -calpain.

The relationship between Hsp70-8 and MyLC-1F in both muscles for BA and Li breeds may be explained by the protective action of members of the Hsp70 family on damaged structural proteins [46]. MyLC-1F is associated with the head region of the myosin molecule [47] and was reported to be released from the myofibrillar fraction during *post-mortem* ageing [48]. From this relationship, we can suggest that heat-shock response may enhance *post-mortem* contractility through a modulation of thick-filament regulation.

Hsp70-Grp75 was linked to various proteins involved in different biological pathways, including glycolytic metabolism (LDH-B and MDH1), proteolysis (μ -calpain), structure (MyLC-1F) and oxidative stress (DJ-1 and Prdx6). Hsp70-Grp75 is a multifunctional member of the Hsp70 family. It is the only known mitochondrial Hsp70 chaperone, and serves as a unique scavenger of toxic protein aggregates [38]. It plays a key role in the folding of matrix-localized mitochondrial proteins and is central in the transport of proteins into the mitochondrion [49]. Its relationship

with μ -calpain agrees with earlier studies reporting that mitochondrial calpain activity is influenced by Hsp70-Grp75 activity [50]. More specifically, Ca^{2+} exerts regulatory effects on calpains [2,51] and Hsp70-Grp75 may enhance Ca^{2+} trafficking from the ER by linking the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor of the endoplasmic reticulum (ER) to the mitochondrial voltage-dependent anion channels [2,52]. The correlation between Hsp70-Grp75 and DJ-1 suggests that the former was further linked to the oxidative pathway, which is coherent with an earlier indication that DJ-1 translocates to the mitochondria after oxidative stress, via Hsp70-Grp75 [53]. The role of Hsp70-Grp75 on Ca^{2+} trafficking from the ER to the sarcoplasm may also explain the relationship between Hsp70-Grp75 and the enzymes of the glycolytic pathway in the present study. In addition, Hsp70-Grp75 is known to be induced by glucose deprivation and agents perturbing glycolysis [38], which may further explain this correlation. We suggest that Grp75 may be involved in the regulation of cell response to variations in glucose levels.

Overall, various correlations were muscle specific. Considering the BA and Li breeds, Hsp70-Grp75 was correlated to proteins belonging to many different biological pathways in the LT muscle, which is coherent with its multifunctional role. For example, in the LT muscle, DJ-1 and μ -calpain showed also many correlations, but these did not involve as many different biological pathways as the proteins correlated with Hsp70-Grp75. In the ST muscle, Hsp70-Grp75 was correlated with small Hsps, but not in the LT muscle. Similarly, in the LT, but not the ST muscle, Hsp40 was correlated with proteins of various biological pathways. Overall, in the LT, more correlations were found between proteins related to the glycolytic pathway and in the ST muscle, more correlations were found with the three small Hsps. These differences may be related to differences in metabolic functioning between the muscles and need further investigation. The proteins in the present

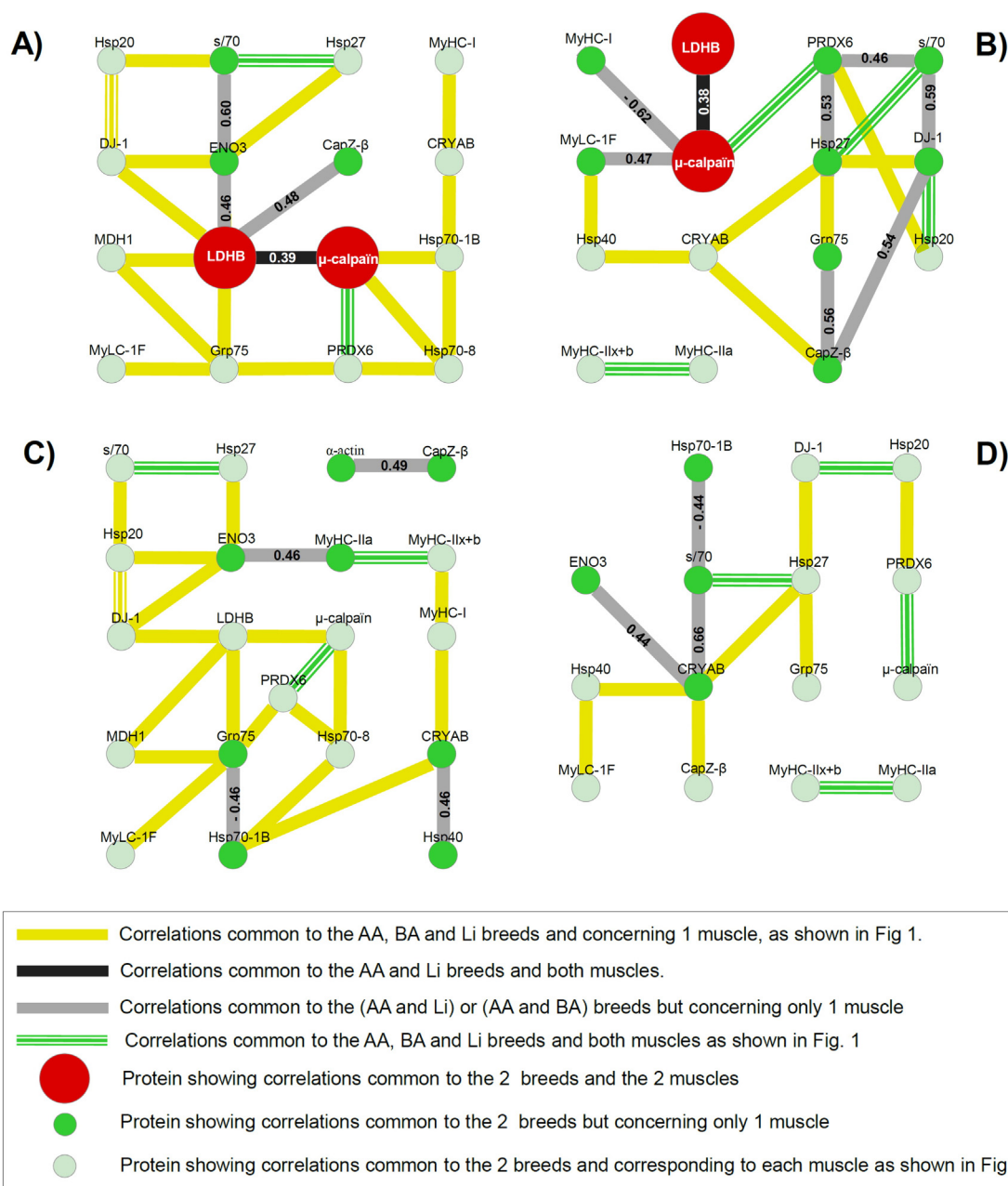


Fig. 3. Correlation networks within breed interactions for AA and Li (A, B) and for AA and BA breeds (C, D) among *Longissimus thoracis* and *Semitendinosus* muscles respectively. The correlation values found using standardized data (Z-scores) are shown on each new interaction line (black and dark grey edges only).

study were selected for their known relationship with tenderness development. The anti-apoptotic function of small Hsps is known to have negative consequences for meat tenderness. The larger amount of correlations between these Hsps and other proteins in the ST muscle may explain the generally lower tenderness of this muscle of the Li and BA breeds [3].

5. Conclusion

The present study demonstrates that several robust relationships exist between proteins belonging to similar or different biological pathways. Particularly, DJ-1 and Prdx6 were correlated with Hsp20 and μ-calpain, respectively, irrespective of muscle and breed. Considering BA and Li bulls only, Hsp70-Grp75, DJ-1 and μ-calpain

were correlated with proteins related to glycolytic, oxidative and Hsps. Results suggest that of the many cellular functions involved in development of tenderness, mitochondrial properties and oxidative stress play a major role and possibly initiating a cascade of reactions involved in the development of tenderness. Proteins with cell protective functions, particularly anti-oxidative proteins and Hsps seem to play key roles. A better understanding of these aspects would increase our knowledge of the mechanisms underlying tenderness according to muscle, breed and gender.

Conflict of interest

The authors have declared that no competing interests exist.

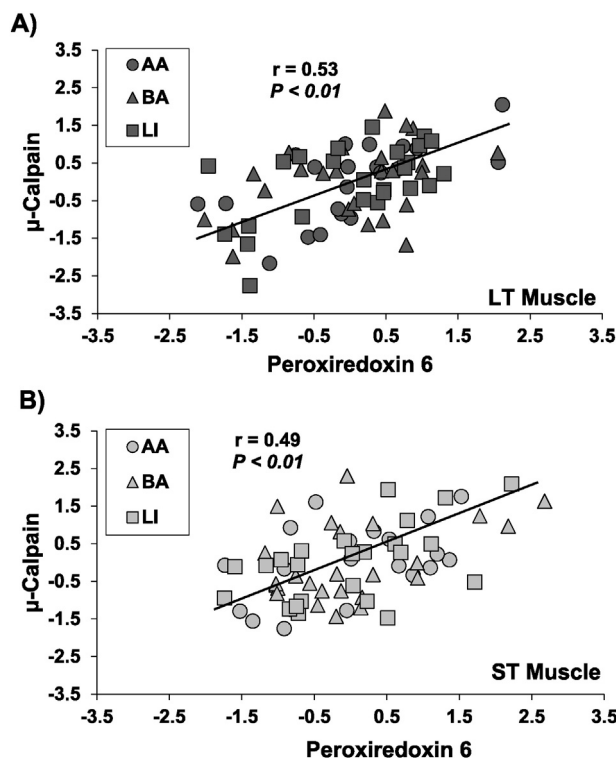


Fig. 4. Example of robust correlations (Pearson correlation analysis on Z-scores) found for the three breeds (○) Aberdeen Angus; (Δ) Blond d'Aquitaine and (□) Limousin between Peroxiredoxin 6 and μ -calpain ($P < 0.01$) for the (A) *Longissimus thoracis* and (B) *Semitendinosus* muscles.

Transparency Document

The [Transparency document](#) associated with this article can be found, in the online version.

Acknowledgements

This work was part of the EU FP6 Integrated Project ProSafeBeef, contract no. FOODCT-2006-36241 (INRA Quality Assurance number AQ284). We gratefully acknowledge the coordinators of the French part of the project Dr. Jean-François Hocquette and Didier Micol for their valuable contribution. The European Union (FP6 -FOODCT-2006-36241) is also gratefully acknowledged for funding. The authors thank INRA UERT (Theix) for animal management and slaughter. We are further thankful to the Franco-Algerian PROFAS B+ programme for the financial support given to Mohammed Gagaoua (PhD).

References

- [1] M. Gagaoua, K. Hafid, Y. Boudida, S. Becila, A. Ouali, B. Picard, et al., Caspases and thrombin activity regulation by specific serpin inhibitors in bovine skeletal muscle, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 177 (2015) 279–303.
- [2] A. Ouali, M. Gagaoua, Y. Boudida, S. Becila, A. Boudjellal, C.H. Herrera-Mendez, et al., Biomarkers of meat tenderness: present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanisms involved, *Meat Sci.* 95 (2013) 854–870.
- [3] B. Picard, M. Gagaoua, D. Micol, I. Cassar-Malek, J.F. Hocquette, C.E. Terlouw, Inverse relationships between biomarkers and beef tenderness according to contractile and metabolic properties of the muscle, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 9808–9818.
- [4] R. Polati, M. Menini, E. Robotti, R. Millioni, E. Marengo, E. Novelli, et al., Proteomic changes involved in tenderization of bovine *Longissimus dorsi* muscle during prolonged ageing, *Food Chem.* 135 (2012) 2052–2069.
- [5] X. Jia, E. Veiseth-Kent, H. Grove, P. Kuziora, L. Aass, K.I. Hildrum, et al., Peroxiredoxin-6—a potential protein marker for meat tenderness in bovine *longissimus thoracis* muscle, *J. Anim. Sci.* 87 (2009) 2391–2399.
- [6] M.F. Te Pas, A.J. Hoekman, M.A. Smits, Biomarkers as management tools for industries in the pork production chain, *J. Chain Netw. Sci.* 11 (2011) 155–166.
- [7] M. Pierzchala, A.J.W. Hoekman, P. Urbanski, L. Kruij, L. Kristensen, J.F. Young, et al., Validation of biomarkers for loin meat quality (*M. longissimus*) of pigs, *J. Anim. Breed. Genet.* (2014) (n/a–n/a).
- [8] M. Gagaoua, D. Durand, D. Micol, V. Santé-Lhoutellier, C. Terlouw, M.P. Ellies-Oury, et al., Biomarkers of meat sensory qualities of Angus beef breed: towards the development of prediction equations, 15èmes JSMTV, Viandes & Produits Carnés, Clermont-Ferrand 2014, pp. 137–138.
- [9] M. Gagaoua, C. Terlouw, D. Micol, A. Boudjellal, J.F. Hocquette, B. Picard, Proteomic biomarkers of meat colour of Blonde d'Aquitaine young bulls: towards a better comprehension of the biological mechanisms, Proceedings of the 61st International Congress of Meat Science and Meat Technology 2015, pp. 1–4 (Clermont-Ferrand, France).
- [10] B. Picard, C. Berri, L. Lefaucheur, C. Molette, T. Sayd, C. Terlouw, Skeletal muscle proteomics in livestock production, *Brief. Funct. Genomics* 9 (2010) 259–278.
- [11] M. Gagaoua, E.M. Terlouw, D. Micol, A. Boudjellal, J.F. Hocquette, B. Picard, Understanding early post-mortem biochemical processes underlying meat color and pH decline in the longissimus thoracis muscle of young blond d'Aquitaine bulls using protein biomarkers, *J. Agric. Food Chem.* 63 (2015) 6799–6809.
- [12] N. Guillemin, M. Bonnet, C. Jurie, B. Picard, Functional analysis of beef tenderness, *J. Proteome* 75 (2011) 352–365.
- [13] B. Picard, F. Lefevre, B. Lebret, Meat and fish flesh quality improvement with proteomic applications, *Anim. Front.* 2 (2012) 18–25.
- [14] B. Picard, M. Gagaoua, M. Kammoun, C. Terlouw, J.F. Hocquette, D. Micol, Biomarkers of beef tenderness in young bulls of three breeds, Proceedings of the 59th International Congress of Meat Science and Technology 2013, pp. 1–4 (Izmir, Turkey).
- [15] C. Bourguet, V. Deiss, A. Boissy, E.M.C. Terlouw, Young Blond d'Aquitaine, Angus and Limousin bulls differ in emotional reactivity: relationships with animal traits, stress reactions at slaughter and post-mortem muscle metabolism, *Appl. Anim. Behav. Sci.* 164 (2015) 41–55.
- [16] J. Bouley, C. Chambon, B. Picard, Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry, *Proteomics* 4 (2004) 1811–1824.
- [17] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [18] N. Guillemin, B. Meunier, C. Jurie, I. Cassar-Malek, J.F. Hocquette, H. Leveziel, et al., Validation of a Dot-Blot quantitative technique for large scale analysis of beef tenderness biomarkers, *J. Physiol. Pharmacol.* 60 (Suppl 3) (2009) 91–97.
- [19] B. Picard, C. Barboiron, D. Chadeyron, C. Jurie, Protocol for high-resolution electrophoresis separation of myosin heavy chain isoforms in bovine skeletal muscle, *Electrophoresis* 32 (2011) 1804–1806.
- [20] B. Picard, I. Cassar-Malek, Evidence for expression of IIb myosin heavy chain isoform in some skeletal muscles of Blonde d'Aquitaine bulls, *Meat Sci.* 82 (2009) 30–36.
- [21] T. Kinumi, J. Kimata, T. Taira, H. Ariga, E. Niki, Cysteine-106 of DJ-1 is the most sensitive cysteine residue to hydrogen peroxide-mediated oxidation in vivo in human umbilical vein endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317 (2004) 722–728.
- [22] C.M. Clements, R.S. McNally, B.J. Conti, T.W. Mak, J.P. Ting, DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 15091–15096.
- [23] J. Fan, H. Ren, N. Jia, E. Fei, T. Zhou, P. Jiang, et al., DJ-1 decreases Bax expression through repressing p53 transcriptional activity, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 4022–4030.
- [24] J.J. Birktoft, R.T. Fernley, R.A. Bradshaw, L.J. Banaszak, Amino acid sequence homology among the 2-hydroxy acid dehydrogenases: mitochondrial and cytoplasmic malate dehydrogenases form a homologous system with lactate dehydrogenase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79 (1982) 6166–6170.
- [25] K.J. Thomas, M.K. McCoy, J. Blackinton, A. Beilina, M. van der Brug, A. Sandebring, et al., DJ-1 acts in parallel to the PINK1/parkin pathway to control mitochondrial function and autophagy, *Mol. Cell.* 20 (2011) 40–50.
- [26] M.J. Vos, J. Hageman, S. Carra, H.H. Kampinga, Structural and functional diversities between members of the human HSPB, HSPH, HSPA, and DNAJ chaperone families, *Biochemistry* 47 (2008) 7001–7011.
- [27] N. Golenhofen, M.D. Perng, R.A. Quinlan, D. Drenckhahn, Comparison of the small heat shock proteins alphaB-crystallin, MKBP, HSP25, HSP20, and cvHSP in heart and skeletal muscle, *Histochem. Cell Biol.* 122 (2004) 415–425.
- [28] O.V. Bukach, A.E. Glukhova, A.S. Seit-Nebi, N.B. Gusev, Heterooligomeric complexes formed by human small heat shock proteins HspB1 (Hsp27) and HspB6 (Hsp20), *Biochim. Biophys. Acta* 2009 (1794) 486–495.
- [29] E.V. Mymrikov, A.S. Seit-Nebi, N.B. Gusev, Large potentials of small heat shock proteins, *Physiol. Rev.* 91 (2011) 1123–1159.
- [30] Y. Jammes, J.G. Steinberg, S. Delliaux, F. Bregeon, Chronic fatigue syndrome combines increased exercise-induced oxidative stress and reduced cytokine and Hsp responses, *J. Intern. Med.* 266 (2009) 196–206.
- [31] M.A. Smith, R.G. Schnellmann, Calpains, mitochondria, and apoptosis, *Cardiovasc. Res.* 96 (2012) 32–37.
- [32] A.B. Fisher, Peroxiredoxin 6: a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A(2) activities, *Antioxid. Redox Signal.* 15 (2011) 831–844.
- [33] Z.A. Wood, E. Schroder, J. Robin Harris, L.B. Poole, Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins, *Trends Biochem. Sci.* 28 (2003) 32–40.
- [34] L.J. Rowe, K.R. Maddock, S.M. Lonergan, E. Huff-Lonergan, Oxidative environments decrease tenderization of beef steaks through inactivation of μ -calpain, *J. Anim. Sci.* 82 (2004) 3254–3266.
- [35] Y. Manevich, T. Shuvaeva, C. Dodia, A. Kazi, S.I. Feinstein, A.B. Fisher, Binding of peroxiredoxin 6 to substrate determines differential phospholipid hydroperoxide

- peroxidase and phospholipase A(2) activities, *Arch. Biochem. Biophys.* 485 (2009) 139–149.
- [36] A. Ouali, C.H. Herrera-Mendez, G. Coulis, S. Becila, A. Boudjellal, L. Aubry, et al., Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms, *Meat Sci.* 74 (2006) 44–58.
- [37] S.J. Martin, C.P. Reutelingsperger, A.J. McGahon, J.A. Rader, R.C. van Schie, D.M. LaFace, et al., Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl, *J. Exp. Med.* 182 (1995) 1545–1556.
- [38] M.P. Mayer, Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism, *Trends Biochem. Sci.* 38 (2013) 507–514.
- [39] M. Daugaard, M. Rohde, M. Jaattela, The heat shock protein 70 family: highly homologous proteins with overlapping and distinct functions, *FEBS Lett.* 581 (2007) 3702–3710.
- [40] B. Jiang, P. Liang, G. Deng, Z. Tu, M. Liu, X. Xiao, Increased stability of Bcl-2 in HSP70-mediated protection against apoptosis induced by oxidative stress, *Cell Stress Chaperones* 16 (2011) 143–152.
- [41] C. Bernard, I. Cassar-Malek, M. Le Cunff, H. Dubroeuq, G. Renand, J.F. Hocquette, New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 5229–5237.
- [42] A.K. Mahalka, T. Kirkegaard, L.T. Jukola, M. Jaattela, P.K. Kinnunen, Human heat shock protein 70 (Hsp70) as a peripheral membrane protein, *Biochim. Biophys. Acta* 2014 (1838) 1344–1361.
- [43] A.K. Mahalka, C. Code, B.R. Jahromi, T. Kirkegaard, M. Jaattela, P.K. Kinnunen, Activation of phospholipase A2 by Hsp70 in vitro, *Biochim. Biophys. Acta* 2011 (1808) 2569–2572.
- [44] H.M. Beere, Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways, *J. Clin. Investig.* 115 (2005) 2633–2639.
- [45] S. Sahara, T. Yamashima, Calpain-mediated Hsp70.1 cleavage in hippocampal CA1 neuronal death, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393 (2010) 806–811.
- [46] E.H. Miyabara, T.L. Nascimento, D.C. Rodrigues, A.S. Moriscot, W.F. Davila, Y. AitMou, et al., Overexpression of inducible 70-kDa heat shock protein in mouse improves structural and functional recovery of skeletal muscles from atrophy, *Pflugers Arch.* - Eur. J. Physiol. 463 (2012) 733–741.
- [47] Y. Au, The muscle ultrastructure: a structural perspective of the sarcomere, *Cell. Mol. Life Sci.* 61 (2004) 3016–3033.
- [48] M.J. Anderson, S.M. Lonergan, E. Huff-Lonergan, Myosin light chain 1 release from myofibrillar fraction during postmortem aging is a potential indicator of proteolysis and tenderness of beef, *Meat Sci.* 90 (2012) 345–351.
- [49] N. Wiedemann, A.E. Frazier, N. Pfanner, The protein import machinery of mitochondria, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 14473–14476.
- [50] T. Ozaki, T. Yamashita, S. Ishiguro, Ca(2)+-induced release of mitochondrial m-calpain from outer membrane with binding of calpain small subunit and Grp75, *Arch. Biochem. Biophys.* 507 (2011) 254–261.
- [51] B. Glancy, R.S. Balaban, Role of mitochondrial Ca2+ in the regulation of cellular energetics, *Biochemistry* 51 (2012) 2959–2973.
- [52] R. Malli, W.F. Graier, Mitochondrial Ca2+ channels: great unknowns with important functions, *FEBS Lett.* 584 (2010) 1942–1947.
- [53] H.M. Li, T. Niki, T. Taira, S.M. Iguchi-Ariga, H. Ariga, Association of DJ-1 with chaperones and enhanced association and colocalization with mitochondrial Hsp70 by oxidative stress, *Free Radic. Res.* 39 (2005) 1091–1099.

Les serpines bovines

Introduction

Les protéases à serine sont omniprésentes et de façon ubiquitaire chez tous les types d'organismes vivants, ainsi que dans les génomes de certains virus. Dans les années 1980, la présence de protéases à sérine dans les cellules musculaires était incertaine. Un grand nombre d'études suggèrent que la plus part des protéases proviendraient des mastocytes (Ouali, 1990). Les protéases à sérine identifiées dans les mastocytes et qui sont impliquées dans la sécrétion des molécules indispensables telles que l'héparine, la sérotonine et d'autres, sont connues comme les chymases et tryptases (Pejler *et al.*, 2007). Quelques années plus tard, les protéases à serine notamment la plasmine, la thrombine, la kallikréine, et d'autres se sont révélées être synthétisées par les cellules musculaires (Sentandreu *et al.*, 2002). La compréhension des mécanismes protéolytiques qui opèrent dans les cellules musculaires, la régulation de leur activité, ainsi que leurs rôles biologiques, représentent aujourd'hui, un grand intérêt pour une meilleure compréhension des mécanismes régissant le processus de transformation du muscle en viande.

Toutes les études menées au cours des quatre dernières décennies sur la qualité de la viande, rapportent que la tendreté est la qualité sensorielle la plus recherchée. De nombreuses enquêtes indiquent que les consommateurs sont prêts à payer plus cher pour une viande bovine aux qualités garanties (Miller *et al.*, 2001). En conséquence, le problème majeur auquel l'industrie de la viande doit répondre est la maîtrise de la grande variabilité enregistrée pour la tendreté et l'absence d'indicateurs efficaces de cet attribut sensoriel. À ce jour, de nombreuses stratégies ont été menées afin de mettre en lumière les mécanismes qui permettraient de comprendre les principales causes de la variabilité de la tendreté de la viande (Ouali *et al.*, 2013; Gagaoua *et al.*, 2014; Picard *et al.*, 2014).

Par ailleurs, il est connu que cette variabilité est plus ou moins liée à la complexité et l'hétérogénéité du muscle squelettique. De plus, la difficulté dans la maîtrise de cette qualité résulte dans le manque de connaissances concernant les mécanismes biochimiques régissant la transformation du muscle en viande. Malgré tout les efforts au cours de ces dernières décennies pour une meilleure compréhension de ces mécanismes, de nombreuses questions restent encore sans réponses.

La dégradation des protéines au cours du stockage de la viande est due à l'action enzymatique de différents systèmes protéolytiques endogènes au muscle. Une période connue en la phase de maturation ou d'attendrissage de la viande. Cependant, l'efficacité de ces

différents systèmes protéolytiques dans ce processus d'attendrissage a été sujette à controverse depuis des années. Par exemple, pendant longtemps, la calpaïne a été considérée comme la seule enzyme responsable de l'attendrissage de la viande jusqu'à la découverte que le premier événement affectant les cellules musculaires est le déclenchement du phénomène d'apoptose. C'est un processus de mort cellulaire programmée complexe régissant la dégradation concomitante des protéines de structure (Herrera-Mendez *et al.*, 2006a; Ouali *et al.*, 2006; Becila *et al.*, 2010).

L'efficacité des systèmes protéolytiques endogènes est principalement déterminée par la teneur de leurs inhibiteurs protéiques spécifiques (Ouali et Talmant 1990; Shackelford *et al.*, 1991). Ceci a été d'autant plus confirmé dans les travaux de Zamora *et al.* (1996 ; 2005) qui ont montré qu'après abattage des animaux, les taux d'inhibiteurs de protéases à sérine sont les meilleurs prédicteurs de la tendreté parmi une trentaine de variables : calpaines 1 et 2, calpastatine, inhibiteurs de protéases à cystéine, ... etc. La plupart de ces inhibiteurs de type sérine appartiennent à la superfamille des serpins (inhibiteurs de sérine protéase) et certains sont révélés comme étant de forts inhibiteurs de caspases (Herrera-Mendez *et al.*, 2009; Gagaoua *et al.*, 2013), un système protéolytique de protéases à cystéine considéré comme déclencheur du phénomène d'apoptose (Danial et Korsmeyer 2004; Li *et al.*, 2004).

En raison de leur rôle majeur dans la régulation de la protéolyse *post-mortem*, les inhibiteurs de protéases à sérine ont été largement étudiés et caractérisés au cours de ces dernières décennies. Les inhibiteurs de protéases sont omniprésents dans le règne animal, mais les connaissances actuelles sont très limitées sur leurs fonctions biologiques dans le muscle squelettique bovin. La présente synthèse passe en revue les principaux résultats concernant l'identité de ces inhibiteurs, leurs protéases cibles, leurs propriétés ainsi que leurs fonctions biologiques.

Caspases and Thrombin Activity Regulation by Specific Serpin Inhibitors in Bovine Skeletal Muscle

M. Gagaoua, K. Hafid, Y. Boudida, S. Becila, A. Ouali, B. Picard, A. Boudjellal and
M.A. Sentandreu

Publié dans Applied Biochemistry and Biotechnology (2015) 177 (2), 279-303.

Résumé :

Dans les cellules vivantes, les inhibiteurs protéiques constituent l'étape ultime de régulation de l'activité des protéases. Dans cet état de l'art, nous avons survolé toutes les connaissances acquises lors des trois dernières décennies concernant un groupe d'inhibiteurs de protéases à sérine appartenant à la superfamille des Serpines, et identifié au niveau des gènes et protéines dans le muscle bovin. Cette synthèse confortée par de brèves descriptions des protocoles expérimentaux utilisés, rapporte les informations connues sur ce groupe d'inhibiteurs protéiques de type Serpine et leurs fonctions biologiques potentielles dans le muscle bovin. Parmi les huit gènes identifiés chez le bovin, trois serpins ont été purifiées à homogénéité et caractérisées à partir du tissu musculaire. Il s'agit de deux membres de la sous-famille BovSERPINA3, BovSERPINA3-1 et A3-3, et le dernier membre est l'antithrombine III (AT-III ou BovSERPINC1). La sous-famille des BovSERPINA3 comprend au moins 8 membres protéiques codés par des gènes différents localisés au niveau du chromosome 7q23-q26. Les deux inhibiteurs BovSERPINA3-1 et A3-3 sont localisés dans les cellules musculaires et ont une activité inhibitrice croisée contre la trypsine ainsi que la caspase 8 initiateur et la caspase 3 exécuteur. Ces deux inhibiteurs constituent une étape clé pour le contrôle du phénomène d'apoptose dans le muscle. Ils ont été ainsi exprimés dans les phases de prolifération des myoblastes où les cellules doivent être vivantes, mais pas dans les myotubes. L'antithrombine III inhibe la trypsine et, d'une manière héparine-dépendante, la thrombine. L'antithrombine III et son ARNm sont exprimés dans les cellules musculaires et dans les myoblastes primaires en culture en phase de différenciation.

Mots clés : Bovin ; Muscle squelettique; inhibiteurs; Serpins ; Apoptose ; différenciation ; antithrombine.

Caspases and Thrombin Activity Regulation by Specific Serpin Inhibitors in Bovine Skeletal Muscle

**Mohammed Gagaoua, Kahina Hafid,
Yasmine Boudida, Samira Becila, Ahmed
Ouali, Brigitte Picard, Abdelghani
Boudjellal & Miguel Angel Sentandreu**

**Applied Biochemistry and
Biotechnology**

Part A: Enzyme Engineering and
Biotechnology

ISSN 0273-2289

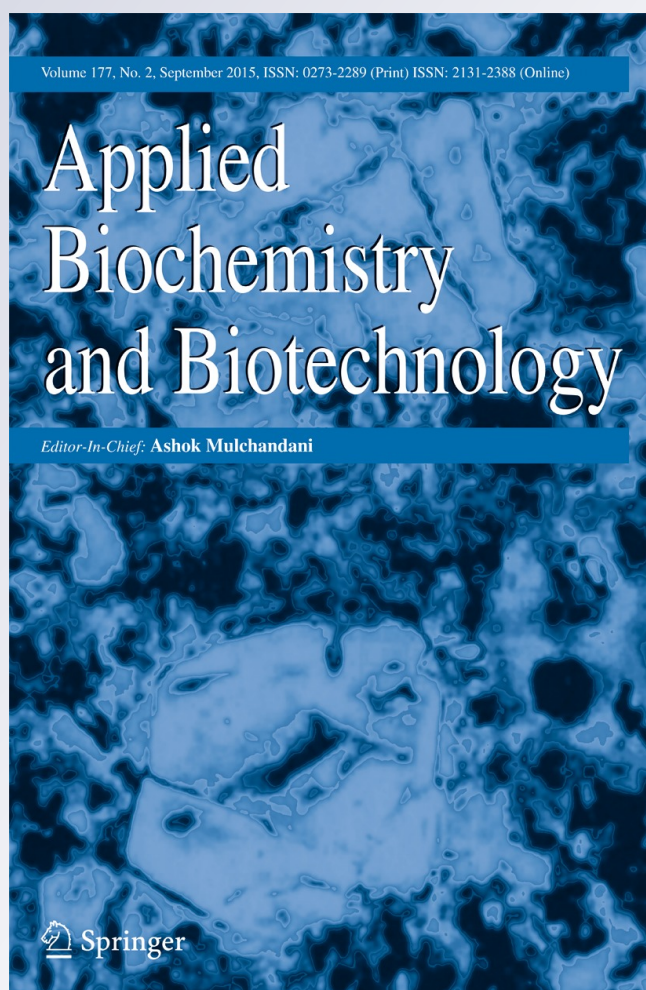
Volume 177

Number 2

Appl Biochem Biotechnol (2015)

177:279-303

DOI 10.1007/s12010-015-1762-4





Caspases and Thrombin Activity Regulation by Specific Serpin Inhibitors in Bovine Skeletal Muscle

Mohammed Gagaoua^{1,3} · Kahina Hafid¹ ·
Yasmine Boudida¹ · Samira Becila¹ · Ahmed Ouali² ·
Brigitte Picard^{3,4} · Abdelghani Boudjellal¹ ·
Miguel Angel Sentandreu⁵

Received: 22 March 2015 / Accepted: 14 July 2015 /
Published online: 25 July 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract In living cells, after activation, protein inhibitors constitute the last step of proteases activity regulation. This review intends to provide original information about a group of bovine muscle serine proteases inhibitors belonging to the Serpin superfamily and characterized at the gene and protein level. This report is the only one and the first to provide much information on this group of proteases inhibitors of the serpin type and their potential biological functions. Amongst the eight genes identified in bovine, three serpins were purified from the muscle tissue and characterized. These are two members of the bovSERPINA3 family, i.e., bovSERPINA3-1 and A3-3, and the last one is antithrombin III (AT-III or BovSERPINC1). BovSERPINA3 family comprises at least eight protein members encoded by different genes mapped on chromosome 7q23–q26 cluster. BovSERPINA3-1 and A3-3 were shown to locate within muscle cells and are cross-class inhibitors strongly active against trypsin as well as against human initiator and effector caspases 8 and 3. They constitute a key apoptosis control in mammals. They were thus expressed in proliferating and confluent myoblasts phases where cells must be alive but not in myotubes. Antithrombin III inhibits

✉ Mohammed Gagaoua
gmber2001@yahoo.fr; mgagaoua@inataa.org

¹ Maquav team, Bioqual Laboratory, INATAA (Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires), Université Frères Mentouri Constantine 1, Route de Ain El-Bey, 25000 Constantine, Algeria

² UR370, QuaPA, INRA-Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France

³ INRA, UMR 1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

⁴ Clermont Université, Vet Agro Sup, UMR 1213 Herbivores, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

⁵ Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC, Calle Agustín Escardino, 7, 46980 Paterna, Valencia, Spain

trypsin and, in a heparin dependent manner, thrombin. AT-III and its mRNA were expressed in muscle cells and in differentiating primary myoblasts in culture.

Keywords Bovine skeletal muscle · Serine proteases inhibitors · Serpins · Apoptosis · Myoblast differentiation · Antithrombin

Introduction

Serine proteases are found ubiquitously in every type of living organisms as well as in many viral genomes. In the 1980s, the presence of serine proteases within muscle cells was doubtful and a large set of investigations suggested that some of them if not all originated from mast cells [63]. The major serine proteases identified in mast cells that are in charge of the secretion of essential molecules including heparin, serotonin, and else are known as chymases and tryptases [70]. Later on, several serine proteases were shown to be synthesized by muscle cells including plasmin, thrombin, kallikrein, and others [80]. Understanding the proteolytic machinery in muscle cells, the regulation of their activity, and their biological importance represents a major challenge.

All surveys carried out over the last four decades on meat quality, emphasized that tenderness is the most important sensory trait of meat in comparison to the other attributes. Many studies indicated that consumers are willing to pay a premium for beef meat as long as it is guaranteed tender [57]. As a result, the major problem that the meat industry has to solve is the management of the large variability in the ultimate tenderness of meat cuts and the absence of accurate predictors of this quality attribute. To date, numerous strategies have been assayed to try to discover those mechanisms that would allow us to understand the main causes of the variability in meat quality [29, 65, 72].

This situation is directly related to the complexity and biological diversity of the skeletal muscle tissue. Unsuccessful management of this quality also results from our lack of knowledge about the complex biochemical mechanisms taking place in post-mortem muscle immediately after animal slaughter. Despite the large efforts developed over the last decades to better understand these mechanisms, many questions remain unsolved. Amongst them, proteolytic processes responsible for hydrolysis of the main structural proteins conforming myofibrils is one of the most relevant with respect to the post-mortem meat tenderness improvement.

Post-mortem protein breakdown is assumed to be caused by the proteolytic action of different endogenous muscle enzyme groups during carcass storage, a period known as meat aging. However, the relevance that the different groups of muscle peptidases can have in this process has been a matter of controversy since years. For a long time, the calpain system was considered to be the primary system responsible for meat tenderization until the discovery that the first event affecting muscle cells is the onset of apoptosis, a complex process governing the cell death process and the concomitant degradation of structural proteins [4, 36, 66].

Efficiency of the endogenous proteolytic system is mainly determined by the level of their specific inhibitors [69, 81]. This statement was confirmed in earlier studies by Zamora et al. [99, 100] who showed that after animal bleeding, serine protease inhibitors levels are the best meat tenderness predictors amongst about 30 quantitative variables measured including

calpains 1 and 2, calpastatin, cysteine protease inhibitors, ...etc. Interestingly, most of them belong to the serpins (serine protease inhibitors) superfamily and some were further shown to be strong inhibitors of caspases [28, 35], a proteolytic group of cysteine proteases considered as the main driver of apoptosis [14, 53].

Because of their major role in post-mortem proteolysis regulation, muscle serine protease inhibitors were extensively investigated in our group over the last decades and characterized. Protease inhibitors are ubiquitous in the animal kingdom but relatively little is known about their biological functions in the bovine skeletal muscle. The present paper reviews the main outcomes regarding their identity, their target proteases, their biological functions, and their implication in post-mortem improvement in meat tenderness. Before that, it would be interesting to briefly present the serpin superfamily and their properties.

General Properties of Serpins

The Serpin Superfamily

Serpins are a group of proteins with similar structures that were first identified as a set of proteins able to inhibit proteases. The acronym serpin was originally coined because many serpins inhibit chymotrypsin-like serine proteases (serine protease inhibitors). Over 3000 serpins have now been identified, which are subdivided into 16 subgroups (A–P) according to their common ancestry. They were found abundantly in eukaryotes and even in some bacteria and archaea and in some viruses [44, 60]. Serpins are thus the largest and most diverse family of protease inhibitors [73].

While most serpins control proteolytic cascades, certain serpins do not inhibit enzymes but instead perform diverse functions such as storage (ovalbumin, in egg white), hormone carriage proteins (thyroxine-binding globulin, cortisol-binding globulin), and molecular chaperones (HSP47). The term serpin is used to describe these latter members as well, despite their non-inhibitory function [83]. Early studies on serpins revealed that the mechanism by which these proteins inhibit target proteases appeared to be distinct from the lock-and-key-type mechanism used by small protease inhibitors such as the Kunitz-type inhibitors (e.g., basic pancreatic trypsin inhibitor). Indeed, serpins form covalent complexes with their target proteases by trapping the enzyme and transporting it to the distal end of the core of the serpin. Hence, the conformational structural change induced to the enzyme makes it no more able to complete the hydrolytic reaction [30, 42].

Serpins are metastable proteins comprising the core of the protein with several strands and an external loop at the C-terminal end called reactive center loop (RCL). This loop contains the target scissile bond for proteases, and its sequence defines the specificity of serpins (Fig. 1a). In the presence of the target enzyme (e.g., trypsin), a Michaelis complex (Fig. 1b) is formed as for all enzyme-substrate interaction and as soon as the acyl-enzyme complex is obtained, the RCL inserts into the protein core transporting with it the enzyme to the opposite side. This induces a large distortion of the active site responsible for the slowing and subsequent abolishment of the catalyzed hydrolysis of the acyl intermediate (Fig. 1c).

Furthermore, it is worth noting that some serpins are able to inhibit cysteine proteases (e.g., caspases and cathepsins) through the same trapping mechanism, by

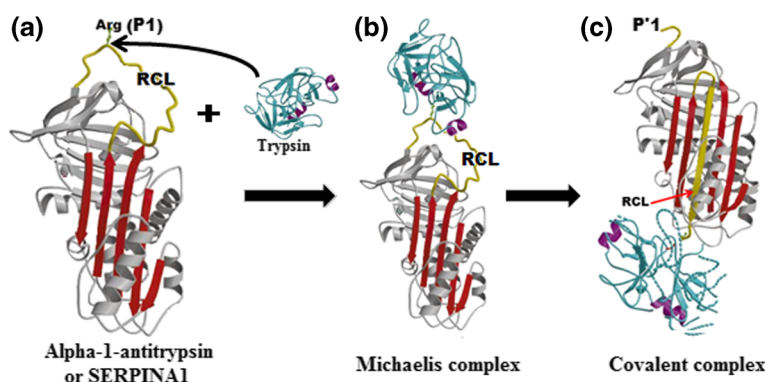


Fig. 1 Serpin structures and conformation. **a** Native b_1 -antitrypsin (PDB entry 1QLP) [19]; **b** Michaelis complex between SERPINA1 (Alaserpin from *Manduca sexta*) and trypsin (PDB entry 1K9O) [98]; **c** Covalent complex between α_1 -antitrypsin and trypsin (PDB entry 1EZS). The enzyme is transported to the distal part of the serpin and undergoes an irreversible deformation responsible of the enzyme inactivation via the reactive center loop (RCL) [43]

alteration of the trapped acyl intermediate from an oxyacyl species to a thioacyl intermediate, leading to a covalent complex with the targeted protease and its concomitant transfer to the distal end of the serpin [17, 35, 79, 90].

Kinetic Analysis of Protease-Serpin Interactions

Stoichiometry of Interaction: Signification and Mode of Determination

The stoichiometry of interaction (SI) reflects the efficiency of the serpin as a proteinase inhibitor (Fig. 2a). SI is the number of moles of serpin needed to generate one mole of kinetically trapped covalent serpin-proteinase complex (E-I). As soon as the acyl intermediate (EI*) has occurred between the proteinase and the exposed RCL, there is a competition between inhibitory (k_4) and substrate (k_3) pathways, the last one regenerating the active enzyme and the cleaved serpin. The relationship of SI to the rate constants is therefore $SI = (k_3 + k_4)/k_4$. Efficient inhibitors are therefore those with SI values close to 1 ($k_4 \gg k_3$), whereas predominantly substrate reactions have large SI ($k_3 \gg k_4$). For accurate comparison between different enzyme/serpin couples, the apparent second-order rate constants (k_{ass}) must be corrected by being multiplied by SI ($k_{ass} = k_{app} \cdot SI$) [77]. Finally, the trapped enzyme/inhibitor complex can dissociate by hydrolysis of the acyl bond, but this occurs at a very slow rate and generally concerns a small amount of the total complex pool [31].

The stoichiometry of interaction is generally measured by titration of a defined concentration of the target enzymes (in the nanomolar range) by addition of increasing amounts of serpins (Fig. 2b). In the example provided, total inhibition of trypsin by boSERPINA3-1 is achieved in the presence of an equimolecular concentration of serpin ($[I]/[E]=1$). Hence, this serpin must be considered as a very efficient inhibitor of trypsin, but the present observation does not mean that trypsin is the *in vivo* target enzyme.

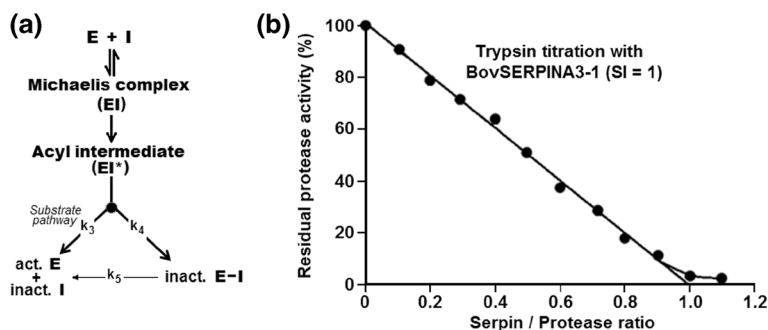


Fig. 2 Serpin pathway mechanism with two potential outcomes (adapted from [83]) **(a)** and determination of the stoichiometry of interaction (SI) of trypsin with bovSERPINA3-1 **(b)**. **a** Schematic major reactions sequence for interaction of serpins (*I*) with proteinases (*E*) with well-defined intermediates, reactants, and products. After cleavage of the scissile bond and formation of the acyl intermediate (EI^*), insertion of the RCL into the core of the serpin can occur and two outcomes are then possible for this intermediate: (1) successful completion of the substrate cleavage pathway with release of active protease (*act. E*) and cleaved serpin (*Inact. I* or truncated *I*) (rate constant k_3); (2) translocation of the protease to the distal end of the serpin and kinetic trapping of the EI^* complex through distortion of the protease (rate constant k_4). The final enzyme/serpin complex ($E-I$) can be hydrolyzed very slowly (k_5) releasing, as in the substrate pathway, truncated serpin *I* (*inact. I*) and active enzyme (*act. E*). **b** Stoichiometry of interaction of trypsin (5 nM) with bovSERPINA3-1 giving a SI value of 1 indicative a very good efficiency of the serpin to inhibit trypsin

Association Rate Constant k_{ass} : Methods of Determination

The rate of protease inhibition by serpins is generally determined by using either the discontinuous or the continuous/progress curve method. The discontinuous method is generally used for low association rate constants of inhibition $<10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Faster association rate constants ($k_{ass} \geq 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) are usually determined using the progress curves method [41]. With the previous methods, the serpin concentration is higher than that of the enzyme level ($[I_0] > [E_0]$). However, under low reactant concentrations (in the nanomolar range) and under second-order conditions ($[E_0] = [I_0]$), k_{ass} can be determined according using an appropriate method [21].

Major Serine Proteinase Fractions in Bovine Muscle Crude Extract

The bovine muscle mostly used for this purpose was *M. diaphragma pedialis*, a muscle containing, as all slow twitch muscles including heart, high amounts of proteases, and inhibitors. Muscles contained a large set of serine protease inhibitors with Mr ranging from 10 to 85 kDa [5, 6, 68, 80]. Gel filtration of a muscle crude extract fractionated three major fractions F1, F2, and F3 [80] with Mr of about 60–85, 40–60, and 10–14 kDa, respectively.

Using different chromatography protocols, two trypsin/elastase inhibitors and a trypsin/thrombin inhibitor were purified to homogeneity from the F1 fraction and characterized [37, 38, 92, 93]. From the N-terminal partial sequences obtained by the Edman sequencing method, they were identified as the following:

- Trypsin/elastase inhibitors

BovSERPINA3-1 previously designed Endopin 1A [37, 38, 92, 93]

BovSERPINA3-3 previously designed Endopin 1B [38]

- Trypsin/thrombin inhibitor

Antithrombin III [37]

From the F2 fraction, we failed to purify to homogeneity any serine proteinase inhibitor probably because (1) most inhibitors of this fraction first shared very close structural and physicochemical properties with the F1 entities and (2) most of them are apparently common to F1 and F2 fractions according to their cross immuno-reactivity towards the antibody raised against bovSERPINA3-1 [27].

The BovSERPINA3 Family

Genomic Organization of the Bovine SERPINA3 Genes

Clustering of serpin genes frequently occurs in mammals genomes as illustrated for human [7], mouse [24], rat [40], and pork [2, 58]. Regarding bovine SERPINA3, a number of eight genes encoding these proteins were sequenced and appeared to be encompassed in the same cluster. They were thus mapped on chromosome 7q23–q26 cluster and spanned over 235 kb [71]. The large number of genes encoding these serpins suggests a probable great complexity of the bovSERPINA3 subfamily of serpins. This complexity was supported by the two-dimensional gel electrophoresis of fractions F1 and F2 who showed multiple spots of glycosylated and phosphorylated proteins when revealed with a polyclonal antibody raised against purified bovSERPINA3-1 [27]. The high sequence homology between the identified members of the bovSERPINA3 family (>75 %) suggests that it exists a degree of compensation and redundancy between them comparable to the redundancy noted for caspases [25]. This redundancy may be concern their respective function in living cells, the multiplicity of their potential target proteases, their mode of action, ...etc.

Stoichiometry of Interaction with Inhibited Proteases

The stoichiometry of interaction was determined by titration of the target enzymes (human leukocyte elastase (HLE), trypsin, caspases 3 and 8) with increasing amounts of either bovSERPINA3-1 (Swiss Prot ID: Q9TTE1) or A3-3 (Swiss Prot ID: Q3ZEJ6). As shown in Table 1a, total inhibition of trypsin and human leukocyte elastase was achieved using equimolar concentrations of either serpins suggesting a 1:1 interaction ratio.

Most serpins so far reported inhibited enzymes with only one active site like trypsin, chymotrypsin, ...etc., and the concentration of enzymes equals the concentration of active sites. Active enzyme concentration is therefore the most accurate value for SI determination ($[E] = [\text{active site}]$). By contrast, titration of caspases with specific inhibitors as Z-VAD-FMK provides the concentration of active sites and not the concentration of active enzymes. As native active caspases contain two active sites, the concentration of native tetrameric caspases equals to half the concentration of active sites ($[E] = 0.5 * [\text{active Sites}]$). For caspases, the concentration of active sites is the accurate value to be considered for the determination of the SI values.

Table 1 Kinetic analysis of protease-serpin interactions. a) Stoichiometry of interaction of bov-serpins with the targeted serine and cysteine proteases (adapted from [35] and [27]). b) Inhibitory pattern of bov-serpinA3-1 and A3-3 and association rate constant (k_{ass} in $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) against different serine and cysteine proteases [38, 93]. The proteases strongly inhibited by the serpins are in italic whereas those for which the inhibition is of no physiological significance are in normal style. Proteases tested are bovine pancreatic trypsin and chymotrypsin, bovine serum plasmin, human leukocyte elastase (HLE), and human recombinant caspases 3 and 8

a)	Stoichiometry of interaction (SI)	
	SerpinA3-1	SerpinA3-3
Trypsin	1.01±0.03	0.98±0.01
HLE	1.04±0.02	1.01±0.03
Caspase 3 ^a	1.01±0.07	0.55±0.07
Caspase 8 ^a	0.49±0.09	0.51±0.06
b)	Association rate constant (k_{ass}) ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	
	BovSERPINA3-1	BovSERPINA3-3
<i>Trypsin</i>	3.9×10^6	6.7×10^5
<i>HLE</i>	2.4×10^7	1.3×10^6
Chymotrypsin	$<10^3$	$<10^3$
Plasmin	$<10^3$	$<10^3$
<i>Caspase 3^a</i>	4.2×10^5	1.5×10^5
<i>Caspase 8^a</i>	1.4×10^6	2.7×10^6

^aSI=[I]/[caspase active sites]

According to the results in Table 1a, a 1:1 interaction of bovSERPINA3-1 with active sites was needed to fully inactivate caspase 3, i.e., two moles of inhibitor for one mole of active caspases. In other words, binding of one mole of inhibitor to each active site and two serpins molecules for each native tetrameric caspases are required for total inhibition of caspase 3. With respect to all other enzyme/inhibition interactions, i.e., caspase 3/bovSERPINA3-3, caspase 8/bovSERPINA3-1, and caspase 8/bovSERPINA3-3, binding of one mole of inhibitor inactivates two active sites, meaning that binding of one serpin molecule induces a sufficient allosteric conformational change of the tetrameric native caspase to make the second site unable to bind substrates. Another reason could be the dissociation of the tetrameric caspase structure due to the important constraints induced to the multimeric protease as observed for the inhibition of caspases by cytokine response modifier A [17]. Such dissociation will indeed lead to the disappearance of the second active site in the native enzyme which is no more tetrameric.

Association Rate Constant (k_{ass}) Towards Different Cysteine and Serine Proteases

Regarding this constant, we must keep in mind that k_{ass} values $\leq 10^3 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ are of no physiological significance. Association rate constant towards a set of serine and cysteine proteases was therefore determined for both serpins according to Schechter and Plotnick [77] and Horvath et al. [41]. As previously reported [27], both bovSERPINA3-1 and A3-3 do not inhibit the following serine proteases: cathepsin G, elastase kallikrein, urokinase, plasminogen activator, and thrombin. No inhibition was observed against the most common cysteine proteases including papain, cathepsins B, H, and L, and calpains 1 and 2. By contrast, they both strongly inhibit

trypsin and elastase, two serine proteases, together with caspases 3 and 8. Both caspases 3 and 8 were further shown to form SDS-stable complexes with these serpins [27, 28, 35].

Three essential particular features of bovSERPINA3/caspases interactions must be emphasized: (a) formation of SDS-stable complexes with targeted caspases, (b) nature and localization of the target scissile bond, (c) in situ caspases/bovSERPINA3 complexes detection in post-mortem muscle and consequences.

Formation of SDS-Stable Complexes with Target Proteases

One hallmark of serpins is their ability to form SDS-stable complexes with their target proteases. Serpins are restricted to inhibiting proteinases of only the serine mechanistic class. However, at least two serpins are now known to demonstrate cross-class inhibition of several different types of cysteine proteinases: the viral serpin cytokine response modifier A (*CrmA*) inhibits caspase-1 [51], a member of the caspases family, a group of cysteine proteases distinct from the papain-like cysteine proteases [95, 97], and the human serpin squamous cell carcinoma antigen 1 (SCCA1) inhibits the papain-like cysteine proteinases cathepsins S, K, and L [78, 79, 91]. For both serpins, it was demonstrated that they use very likely a common reactive center loop (RCL)-dependent mechanism to inhibit serine and cysteine proteases [17, 78]. We previously reported that bovSERPINA3-1 and A3-3 are strong inhibitors of initiator and effector caspases [27, 28, 35] and form stable complexes with their target cysteine proteases, a feature supported by the half-life times of the different caspase/bovSERPINA3 complexes ranging between 7 min and 16 days [39]. These are therefore new mammalian serpins capable to inhibit cysteine proteases especially human caspases 8 and 3 but not cysteine proteases of the papain family. In contrast to the viral *CrmA*, both serpins form an SDS-stable complex with either caspases. Interestingly, all complexes exhibit a similar *Mr* of about 112–113 kDa as assessed by SDS-PAGE and comprise very likely the serpin covalently bound to half of the tetrameric native caspases, i.e., a heterodimeric moiety. As for *CrmA*, trapping of the caspases by bovSERPINA3s and its distortion to the core of the serpin induces very likely a rapid dismantling of the initial native tetrameric caspase structure into their heterodimeric moiety which would explain that only one mole of serpin inhibited two active sites. Although the mechanisms of action of bovSERPINA3-1 and A3-3 on caspases inhibition have not been investigated in detail, one could think that they use the same trapping mechanism than with serine proteases, an assumption agreeing well with the earlier studies by Gettins group [90].

These are therefore some examples that lead us to ask questions about the assertion of Gettins [31]. In his review, the author pointed out that it is doubtful to think that “cysteine proteinases might be inhibited by the same conformation change-based mechanism as serine proteinases arguing that no high molecular weight SDS-stable band has been demonstrated on PAGE for a serpin-cysteine proteinase complex that would correspond to a covalent thioacyl intermediate between serpin and proteinase”. The author concluded “that it is unlikely that a thioester present in the intact cysteine proteinase-serpin complex would resist to the analytical procedure”, i.e., the usual preliminary heating at 95 °C for 5 min in the presence of 2–4 % SDS for SDS-PAGE analysis. The only one exception to the basic rule of SDS-stable complex formation between serpin and cysteine protease is *CrmA* for which such complex has never been detected after using the normal denaturing conditions. Such complex has been only detected after mild denaturing conditions or after electrophoresis in non-denaturing conditions [17].

Nature and Localization of the Target Scissile Bond Within the RCL

It is well established that from relations between the known target proteinases of certain serpins and the P1 residue of the serpin RCL that the primary determinant of specificity is the P1 residue. For example, the viral serpin CrmA has a P1 aspartate and inhibits aspartate-specific proteinases of the caspase family. On the other hand, mechanism of kinetic trapping of proteinases by serpins requires at least a distortion of the proteinase active site to compromise or abrogate its catalytic competence. Achievement of this goal needs (i) an over-tight apposition of the two proteins in the covalent complex after insertion of the cleaved RCL into β -sheet A, (ii) the concomitant translocation of the proteinase to the distal end of the serpin, and (iii) its following compression to the core of the serpin and subsequent distortion. Full insertion of the RCL within the core of the serpin implies a similar length of the β -sheet and the inserted arm of the RCL. Statistically, the length of this arm (RCL length up to the scissile bond) is almost always 17 residues which reduced extensively the potential P1 residue identity for inhibition of target proteases. The invariance of the RCL length is an absolute necessity to allow a full translocation of the proteinase to the distal pole of the serpin and its increase seems to induce a predominance of the substrate pathway (k_3 in Fig. 2a), with a release of active enzyme and truncated serpin, at the expense of the formation of a stable complex (k_4 in Fig. 2a).

The respective RCL sequences of boVSERPINA3-1 and A3-3 are depicted in Fig. 3. As previously reported, and according to the cleaving specificities of both proteases, the P1 residue for trypsin is Arg¹⁶ (R) whereas that of elastase is Thr¹⁷ (T) [38, 93]. For both serine proteases, the boVSERPINA3's RCL length up to the scissile bonds agrees well with the established rule of a maximum of 17 residues (16 residues for trypsin and 17 residues for elastase). As caspases are aspartate-specific proteases, we have to look for an Asp residue in these sequences. The only one Asp (D) residue is at position 37 in the RCL sequence of both bovine serpins far away from the common 17th residue we generally refer to. To confirm this feature, Asp³⁷ (Asp³⁷¹ in the native protein) residue of recombinant boVSERPINA3-3 was substituted to Ala³⁷ by site-directed mutagenesis and the activity of both mutated (M-D37/A37) and wild-type (WT) recombinant proteins was tested against both trypsin and caspase 3. Trypsin is similarly inhibited by the recombinant WT and the M-D³⁷/A³⁷ boVSERPINA3-3, and both mutated and WT serpins formed a SDS-stable complex with the serine protease. By contrast, caspase 3 is no more inhibited with the mutant M-D³⁷/A³⁷ boVSERPINA3-3 as compared to the wild-type recombinant protein and, as expected, SDS-stable complex was obtained for the WT but not for the mutated serpin [8, 35]. This allows us to conclude that the P1 residue for caspases is very likely Asp³⁷ or Asp³⁷¹ in the native protein.

The major differences between serine proteases and caspases is that the latter contains two active sites and are two- to threefold larger than trypsin and elastase, the two serine proteases

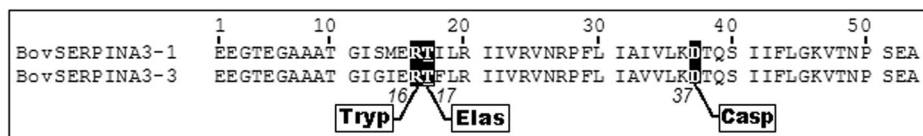


Fig. 3 RCL sequence of boVSERPINA3-1 and A3-3 (adapted from [35]). White letters on black background indicate the P1 residues for the different inhibited enzymes including trypsin (Tryp), elastase (Elas), and caspases (Casp)

strongly inhibited by both bovSERPINA3-1 and A3-3. Whether such long RCL needed to trap the high Mr caspases remains an open question further studies of the time dependent behavior of the caspase/serpin complexes will be necessary. Another point needing additional investigations is providing more insights to the question on whether the substrate pathway (k_3) of Fig. 2a will predominate over the caspase/serpin stable complex pathway (k_4) as soon as trapping of caspases has been completed as suggested for CrmA/complexes [17].

In Situ Caspases/SERPINA3 Complexes Detection in Post-mortem Muscle

BovSERPINA3 strongly inhibit caspases 3 and 8 and are able to form covalent complex with their target cysteine proteases. Therefore, we recently sought to verify whether such complexes can be detected in post-mortem muscles. This was done in different bovine muscles including the diaphragma pedialis (DP), rectus abdominis (RA), and semitendinosus (ST) excised 1 to 1.5 h post-mortem. Unexpectedly, a large amount of SDS-stable complexes (Fig. 4b) with a similar Mr (≈ 113 kDa) than those obtained in vitro after SDS-PAGE analysis of caspase/bovine serpin mixtures (Fig. 4a) were obtained. In post-mortem muscle (Fig. 4b), the amount of free bovSERPINA3 varies from one muscle to another. The highest amounts of free bovSERPINA3 were found in DP muscle where the dimer of about 140 kDa is still discernible. Otherwise, no 70 kDa (bovSERPINA3) band and only a few amount of the latter are detectable in RA and ST muscles, respectively. The dimer is no more detectable in both RA and ST muscles [39]. Although such complexes are not often observed in post-mortem muscles, this finding suggest that, in situ, caspases are probably the target enzyme of members of the bovSERPINA3's family capable of strong inhibition of these aspartate-specific cysteine proteases. Furthermore, in agreement to an earlier report, large amounts of such complexes will slow down the apoptotic process and probably favors greater ultimate toughness of the meat cuts [99].

Cellular Localization, Tissue Distribution, and Polymorphism

Immunolocalization of bovSERPINA3-1 carried out on transverse sections of freshly excised adult bovine longissimus muscle using a specific polyclonal rabbit antiserum revealed that muscle serpins are highly concentrated between the plasma membrane and myofibrils, whereas

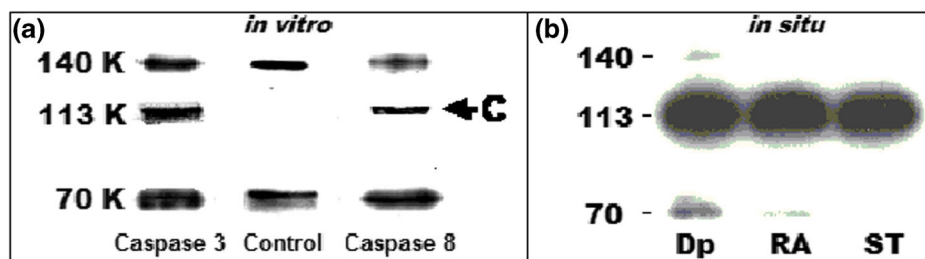


Fig. 4 SDS-stable complexes of bovSERPINA3 with target enzymes as revealed **a** in in vitro analysis of caspase/serpin mixtures (from [35, 65]) and **b** in post-mortem muscle extracts from three different bovine muscles: *Dp* M. diaphragma pedialis, *RA* rectus abdominis, and *ST* semitendinosus (unpublished data). Proteins were labeled with a rabbit polyclonal antibody raised against purified bovSERPINA3-1

lower fluorescence intensity can be seen within the myofibrils, indicating that muscle serpins are exclusively intracellular with a preferential peripheral localization [93].

BovSERPINA3-1, A3-3, and other closely related serpins seem to be ubiquitous [27, 93] and present in most bovine tissues and fluids. Highest concentrations were found in bovine plasma (≈ 1 mg/ml) followed by liver (14 $\mu\text{g/g}$ wet tissue) and kidney (2 $\mu\text{g/g}$ wet tissue) [27]. The lowest levels were observed in striated muscles especially muscle diaphragma with about 1 $\mu\text{g/g}$ wet tissue. Using the same anti-bovSERPINA3-1 polyclonal antibody, closely related serpins were found in all tissues of other species tested including rat, mouse, lamb, and pork and in human tissues and plasma as well.

At least eight genes encoding this family of homologous proteins were identified suggesting that a minimum of eight different proteins would be expected. In fact, as they were glycosylated [8] and phosphorylated to various extent, the number of isoforms is much larger. This assumption was confirmed by either one- or two-dimensional gel electrophoresis of fractionated muscle extracts [27, 28]. BovSERPINA3 therefore constitutes a highly polymorphic group of serpins, most of them being able to strongly inhibit initiator and effector caspases [27, 28, 35, 38].

Potential Biological Functions

Based on their ability to inhibit initiator and effector caspases, two major functions have been identified. The first one concerns the regulation of apoptosis through direct pseudo-irreversible inhibition of caspases. The second is a consequence of the first one since they probably contribute to the survival of muscle cells in the two first phases of differentiation, i.e., proliferation and confluent phases. But before that, let us come back briefly on apoptosis events and their regulation.

Major Apoptosis Events and Regulation

Apoptosis is a programmed cell death that involves the controlled dismantling of intracellular components while avoiding inflammation and damage to surrounding cells. The mechanisms of apoptosis are highly complex and sophisticated, involving an energy-dependent cascade of molecular events [15, 20, 25]. To date, research indicates that there are two main apoptotic pathways: the extrinsic or death receptor pathway and the intrinsic or mitochondrial pathway. Whatever the nature of the initiator stimuli, the apoptotic process is essentially driven by caspases, a group of cysteine-ASPartyl proteASES specifically cleaving polypeptide chains after an aspartyl residue and ends up with the activation of executioner caspases that subsequently coordinate their activities to demolish key structural proteins and activate other enzymes [20, 25].

The extrinsic signaling pathways that initiate apoptosis involve transmembrane receptor-mediated interactions. Upon ligand binding to the death receptors, cytoplasmic adapter proteins (fas-associated death domain (FADD), TNF receptor-associated death domain (TRADD)) which will in turn associates with initiator caspases, catalyzes the auto-catalytic activation of procaspases (caspases 8 or 10). Death receptor-mediated apoptosis can be inhibited by a protein called FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) which will bind to FADD and caspase 8, rendering them ineffective [47, 76]. Downstream, apoptosis can be inhibited by inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) a group of caspases' inhibitors. Once initiator caspases

are activated, the execution phase of apoptosis is triggered through proteolytic activation of the effector caspases [50].

The intrinsic signaling pathways involved a series of diverse mitochondrial-initiated events. The stimuli that initiate the intrinsic pathway produce intracellular signals that may act in either a positive or negative fashion. Negative signals involve the absence of certain growth factors, hormones, and cytokines that can lead to failure of suppression of death programs. Positive signals include, but are not limited to, radiation, toxins, hypoxia, hyperthermia, viral infections, and free radicals. In post-mortem muscle, hypoxia is very likely the main signal triggering apoptosis. All of these stimuli cause changes in the mitochondrial membrane that results in the release of two main groups of normally sequestered pro-apoptotic proteins from the inter-membrane space into the cytosol especially cytochrome c but not only [65, 75]. The control and regulation of these apoptotic mitochondrial events occur through members of the Bcl-2 family of proteins [13]. The Bcl-2 family of proteins governs mitochondrial membrane permeability and can be either pro-apoptotic (Bax, Bak, Bid, Bad, Bim/Bad, Noxa...) or anti-apoptotic (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1...) [34, 96]. These proteins have a great significance since they can determine if the cell commits to apoptosis or aborts the process. It is thought that the main mechanism of action of the Bcl-2 family of proteins is the regulation of cytochrome c release from the mitochondria via alteration of mitochondrial membrane permeability [46, 82].

The extrinsic and intrinsic pathways both end at the point of the execution phase, considered as the final pathway of apoptosis (Fig. 5). Once activated, effector caspases (caspase-3, -6, and -7) activate in turn a cytoplasmic endonuclease, which degrades nuclear material, and degrade the nuclear and cytoskeletal proteins including cytoskeletal and filamentous gelsolin [52], a protein acting as a nucleus of actin polymerization and many others [86].

BovSERPINA3: an Additional Ultimate Control Point of Apoptosis

It is well established that pathological conditions featuring excessive apoptosis may benefit from inhibiting apoptosis. In this respect, the identification and exploitation of new targets remain a considerable focus of attention [59] including inhibition of Bcl-2 proteins, stimulation of the IAP (inhibitors of apoptosis proteins) family, the only one caspase inhibitor known to be expressed in mammalian cells [26], ...etc. BovSERPINA3 subfamily comprises natural caspases inhibitors and might constitute an interesting new target for apoptosis inhibition in vivo and post-mortem muscle [27]. It is probably even truer that these serpins are much more effective inhibitors of caspases than IAPs.

This latter assumption is supported by the fact that trypsin inhibitors, most of which are also caspases inhibitors, quantified by titration in crude muscle extracts were found to be a better predictor of ultimate meat tenderness than calpain 1 and 2 levels, calpastatin concentration, and level of cysteine proteases inhibitors assessed through inhibition of a pre-titrated papain preparations. These serine protease inhibitors are mainly composed of cross-class inhibitory serpins able to inhibit strongly and pseudo-irreversibly initiator and effector caspases as bovSERPINA3-1 to A3-6 and would be good candidates for accurate biomarkers of meat tenderness. Highest levels of serpins inhibiting caspases are thus observed in toughest meat [99, 100]. As depicted in the schematic representation of apoptotic events (Fig. 5), bovSERPINA3 may constitute a serious pathway of apoptosis inhibition by acting against initiator (caspase 8 or caspase 9) and effector caspases (caspases 3, 6, and 7). Recent findings indeed emphasized the ability of bovSERPINA3

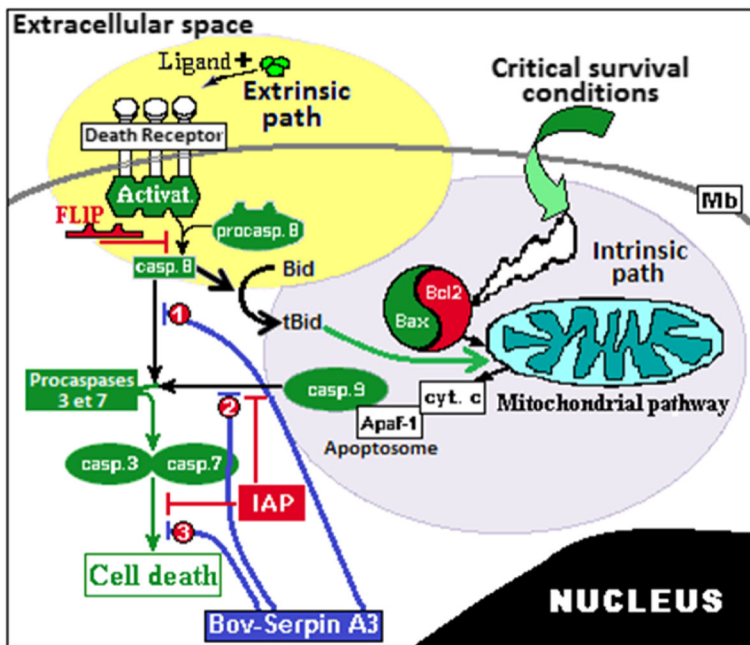


Fig. 5 Schematic representation of the two major pathways of apoptosis and the main regulatory points (adapted from [27]). These are the extrinsic pathway initiated by extracellular signals binding to the death receptor and the intrinsic pathway or mitochondrial pathway activated as soon as cells are in critical survival conditions (radiation, toxins, hypoxia, hyperthermia, viral infections, ...etc.). The pathway is controlled at the level of the caspase 8' activator complex by FLIP (FLICE-inhibitory protein) acting as a competitive ligand to the activator and, downstream in the process, by IAPs, a group of proteins inhibiting caspase 9 but not caspase 8 and effector caspases. The intrinsic pathway is mainly regulated by the ratio of pro- and anti-apoptotic members of the Bcl-2 family. The main mechanism of action of the Bcl-2 family of proteins is the regulation of cytochrome c release from the mitochondria via alteration of mitochondrial membrane permeability. Released cytochrome c then binds to Apaf-1 to form the apoptosome complex in charge of caspase 9 activation. BovSERPINA3 family members are able to inhibit apoptosis through initiator (caspases 8, 9, and 10) and effector (caspases 3, 6, and 7) caspases inactivation

proteins to inhibit efficiently caspases 6, 7, 9, and 10 in addition to caspases 3 and 8 (unpublished data), covering therefore all inhibition steps of the apoptotic' phases.

BovSERPINA3: Potential Control of Muscle Cells Differentiation

During the process of muscle development, myoblasts proliferate and then undergo differentiation, fusing to form multinucleated myotubes. During the proliferating phase, it was suggested that myoblasts are protected against cell death by different still unclear mechanisms. Some authors even suggested that this protection is mediated by thrombin [11], a trypsin-like serine peptidase expressed by muscle cells [12].

Because of their function in apoptosis regulation, bovSERPINA3 members could be potential candidates for myoblast survival through inhibition or control of apoptosis. It was therefore decided to follow the expression of these serpins in bovine primary myoblast culture at the different phases of cell differentiation including proliferation, confluence, and myotubes.

In primary myoblast in culture, serpin localization was essentially intracellular in both proliferating (Fig. 6a) and confluent steps (Fig. 6b). When the primary antibody was omitted, no fluorescence was detected (inserts Fig. 6a, b). By contrast, no fluorescence was obtained in differentiated myotubes (Fig. 6c) suggesting that these serpins are no more expressed after fusion into myotubes. These findings support a probable primary role of these serpins in proliferating and confluent phases by prevention of myoblasts from cell death through caspases and, hence, apoptosis inhibition.

Muscle Antithrombin III (AT-III) or BovSERPINC1

Besides the major role of thrombin in the vascular system [23, 55], several extravascular functions have been reported since the 1980s especially in muscle. In this tissue, thrombin is synthesized by muscle cells [12] and acts locally by contributing to synapse remodeling and elimination at the neuromuscular junction [54, 101] but plays also an essential role in muscle cell differentiation [11, 89]. A prerequisite for the activation of thrombin at the neuromuscular junction is the local externalization of phosphatidylserine phospholipids, which contribute to the binding of thrombin activator complex to the membrane [9].

By contrast, the regulation of thrombin activity by specific inhibitors is still debatable. Protease nexin I (PN-I) is the first thrombin inhibitor identified in muscle tissue and since then has been considered to be the natural inhibitor of thrombin [3, 74]. However, the exact origin of PN-I in muscle has never been clearly established. More importantly, the possible local expression of antithrombin III (AT-III), a serpin protein spelled SERPINC1, by muscle cells or other neighboring cell types has never been tested despite the fact that the presence of AT-III within muscle cells has been reported about 10 years ago [10]. In agreement with the finding of these last authors, preliminary analysis of muscle tissue by either western blot or immunohistochemistry always detected the presence of significant amounts of AT-III in this tissue where it has been further intracellularly located [45].

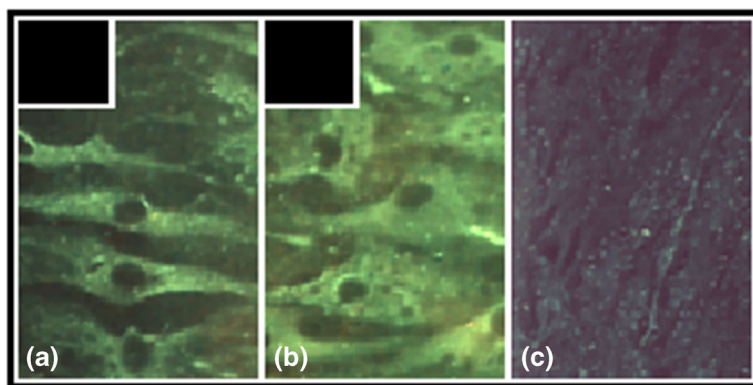


Fig. 6 Cellular expression of bovSERPINA3-1 in primary bovine myoblast culture using the rabbit polyclonal antibody raised against the purified serpin (adapted from [27]. **a** Proliferating myoblasts, **b** confluent myoblasts, **c** growing myotubes. Inserts of Fig. 6a, b are controls for which the primary antibody was omitted

General Outlines of AT-III Biochemical Properties and Cell Localization

The protein purified from bovine muscle with a Mr of 58 kDa has been identified as antithrombin III (BovSERPINC1) using different approaches including western blot carried out with a specific AT-III polyclonal antibody, N-terminal sequencing and MALDI-TOF mass spectrometry analysis [37].

Stoichiometry of interaction (SI) with trypsin (7 nM) and thrombin (9 nM), the most strongly inhibited serine proteases, was performed by adding increasing amounts of this serpin. As depicted in Fig. 7a, for both proteases, equimolar concentrations of AT-III are needed for total inhibition suggesting a 1:1 molar interaction ratio and, hence, a SI of 1. Association rate constants were then determined using trypsin, chymotrypsin, plasmin, and thrombin as target enzymes.

As depicted in Table 2, trypsin and thrombin were inhibited with similar efficiency with k_{ass} of 5.0×10^5 and $1.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively. Chymotrypsin and plasmin are less sensitive to this serpin with k_{ass} one magnitude lower and close to $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Importantly, addition of heparin does not affect the interaction of AT-III with trypsin, chymotrypsin, or plasmin. By contrast, in the presence of 5 μM of heparin, the association rate constant with thrombin is two magnitudes higher than in the absence of heparin shifting from 1.8×10^5 to $2.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Note that all other cysteine (papain, cathepsins B, H, and L, calpains 1 and 2 and caspases 3 and 8) and serine (Elastase, cathepsin G, kallikrein, urokinase, and plasminogen activator) proteases tested were not inhibited by purified muscle AT-III. Serpins are known, as discussed above, to form SDS-stable covalent complexes readily detected as “band shifts” after gel electrophoresis in denaturing conditions with their target enzymes and AT-III did not escape to that rule at least with thrombin as the target enzyme (Fig. 7b).

As thrombin is expressed in muscle cells [12], the expression of its specific inhibitor AT-III could then be expected, an assumption supported by the immuno-histolocalization of this serpin in all fibers of mouse skeletal muscle [10].

The presence of AT-III in bovine muscle was first assessed by analysis of crude muscle extracts by western blot using a polyclonal antibody raised against human AT-III and then by

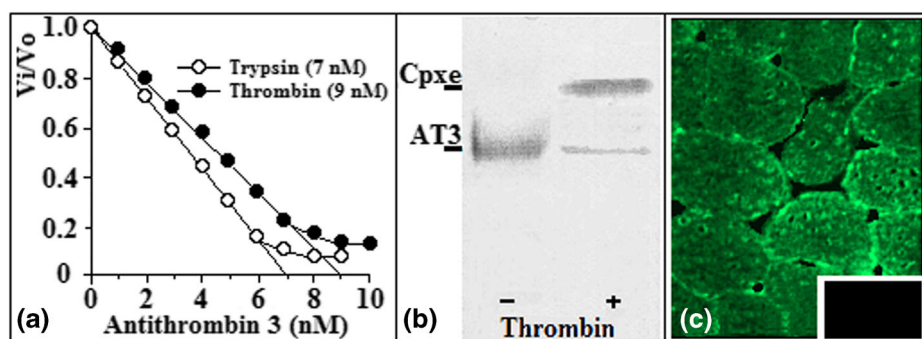


Fig. 7 Inhibitory properties of antithrombin III and cell localization (adapted from [37]). **a** Stoichiometry of interaction with trypsin and thrombin (SI=1). **b** Thrombin/serpin complex formation upon SDS-PAGE analysis of the enzyme/inhibitor mixture. **c** Immunolocalization of AT-III in bovine diaphragm pedialis muscle using a rabbit polyclonal AT-III (1/50) as the primary antibody and the FITC-labeled goat anti-rabbit IgG as the secondary antibody (1/500) (unpublished data)

Table 2 Association rate constants of AT-III for a set of inhibited proteases in the absence or the presence of heparin [37]

Proteases	Cofactor	k_{ass} ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
Trypsin	None	5.0×10^5
Chymotrypsin	None	6.8×10^4
Plasmin	None	1.7×10^4
Thrombin	None	1.8×10^5
	Heparin (5 μM)	2.3×10^7

immunohistochemistry with the same antibody. All western blots performed on muscle crude extracts revealed detectable amounts of AT-III with a Mr of about 58 kDa. Immunohistochemical localization of AT-III was then carried out on transverse section of bovine Diaphragma pedialis muscle to confirm the presence of this protein within muscle fibers. As shown in Fig. 7c, no fluorescence was detected in the extracellular space suggesting that AT-III is a constitutive intracellular protein of muscle cells and is very likely genetically expressed in these cells, an assumption supported by the presence of AT-III's mRNA in the total pool of bovine muscle mRNA. Within muscle fibers, AT-III labeling seemed to be often highly concentrated in the vicinity of the plasma membrane as compared to the inner cytosolic fibers area. When the primary AT-III antibody was omitted, no labeling was detected (insert Fig. 7c). These findings are wholly similar to those of earlier studies [10], which localized three different serum protease inhibitors in mouse skeletal muscle including AT-III.

Potential Biological Functions of Muscle Antithrombin III

Major Functions Ascribed to Thrombin in Skeletal Muscle

Thrombin is mainly known for its pro-coagulant action in blood [23, 55]. However, thrombin has also additional function in other tissues such as brain, vascular endothelium, and skeletal muscle. For more details about thrombin functions in skeletal muscle, the reader must refer to previous reports [37, 66].

Two major functions have been indeed ascribed to thrombin in skeletal muscle cells, which are known to express this protein [32]. The first one is its implication in synapse remodeling and elimination occurring at the neuromuscular junction [101] where the enzyme has been located [1, 56]. The second is the important regulation function in muscle development and muscle cell differentiation [32]. Thrombin was found to cause an increase in the number of cultured myoblasts, possibly through an increase in proliferation [89]. Besides the increase in myoblast number, thrombin further inhibits both myoblast fusion and apoptosis suggesting that thrombin functions as a survival factor for myoblasts [16].

In both functions, thrombin activity is probably regulated by specific inhibitors. As AT-III is expressed by muscle cells, this serpin could be the primary candidate for the control of thrombin activity in muscle tissue. But despite its intracellular localization, we still do not know if this protein is expressed by muscle cells. To address this issue, the transcriptional expression of AT-III in muscle and differentiating myoblasts using liver as a control was investigated.

Transcriptional Expression of AT-III in Liver, Muscle, and Differentiating Myoblasts

The intracellular origin of AT-III was verified by partial cDNA identification in bovine diaphragm muscle. Total RNA was isolated from bovine diaphragm muscle and liver, and reverse transcription was performed. As plasma AT-III is synthesized in liver and then exported, liver PCR was used as positive control. Expression profile suggested by analyses of EST counts indicated that AT-III is expressed in bovine liver (www.ncbi.nlm.nih.gov). cDNAs obtained by reverse transcription from bovine diaphragm muscle and liver were probed by nested PCR using specific sets of primers designed from the bovine *AT-III* gene sequence (GeneBank: NC_007319). The first set of primers corresponds to positions 4097–4116 (in exon 4) and 6553–6571 (in exon 5). The second set of primers were overlapping and designed seven bases downstream and amplified a 2463-bp fragment from genomic DNA and a 389-bp fragment from cDNA.

As indicated in Fig. 8, lanes lv and m, a nested fragment of approximately 400 bp was generated with liver and diaphragm cDNAs. The PCR conditions do not allow to amplify long fragments, superior to 2000 bp on genomic DNA.

Direct sequencing revealed a complete identity between sequences of the amplified DNAs and AT-III cDNA (NM_001034698) thus certifying that the bovine *AT-III* gene is effectively transcribed in this muscle.

To comfort these findings by using a similar approach, the transcriptional expression of AT-III in differentiating myoblasts was investigated. As depicted in Fig. 8, lane 1, no AT-III cDNA was detected in proliferating myoblast, a result in good agreement with previous reports suggesting an improvement of cell proliferation in the presence of active thrombin [11, 33, 48, 89]. By contrast, AT-III cDNA is detected in confluent myoblasts (Fig. 8, lane 2) and in growing myotubes (Fig. 8, lane 3) agreeing well with the inhibition of fusion by active thrombin which must be totally inhibited at these stages. Hence, in differentiating myoblast,

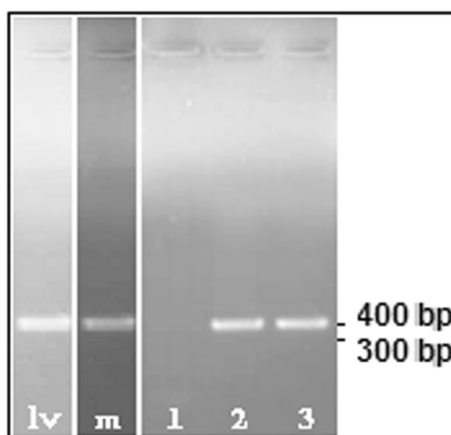


Fig. 8 Transcriptional expression AT-III in muscle and differentiating myoblasts [37]. RT-PCR analysis of total cells mRNAs prepared from liver (*lane lv*), bovine skeletal muscle (*lane m*), proliferating myoblasts (*lane 1*), confluent and fusing myoblast (*lane 2*), and growing myotubes (*lane 3*). A similar nested fragment of approximately 400 bp was generated in the pool of cDNAs isolated from liver, bovine diaphragma pedialis muscle, confluent myoblasts, and myotubes. The PCR conditions do not allow amplifying longer fragments on genomic DNA

expression of AT-III is observed only in confluent myoblasts and in myotubes, two phases where thrombin activity is unsuitable and must be totally inhibited [11, 16, 89].

These findings provide therefore a direct evidence for the transcriptional expression of AT-III in bovine skeletal muscle, a finding consistent with the presence of the protein within muscle cells. As expected, transcriptional expression of AT-III in differentiating primary culture of bovine myoblasts is only observed in the late phases (confluent myoblasts and growing myotubes) when thrombin must be fully inhibited to avoid any inhibition of the fusion process. To confirm these findings, expression of AT-III at the protein level was followed in differentiating primary culture of bovine myoblasts.

Expression of AT-III in Differentiating Primary Culture of Bovine Myoblasts

In developing muscle, thrombin increases the number of cells during myoblast proliferation but delayed skeletal muscle myogenesis through inhibition of myoblast fusion. To test this statement and to comfort the previous findings supporting the presence of AT-III in muscle cells, the expression of this serpin was followed by immunohistochemistry in differentiating primary bovine myoblast cultures. For that, we used a rabbit polyclonal antibody raised against human AT-III and revealed with a FITC conjugate goat anti-rabbit IgG as the secondary antibody. In all the experiments carried out, the cell nuclei were stained in red using the Hoechst method [62]. Hoechst dye, which binds to the minor groove of DNA, has been extensively used by many laboratories for studying nuclear changes occurring during apoptosis [85]. As depicted in Fig. 9a, proliferating myoblast showed no labeling indicative of the absence of this protein within muscle cells. By contrast, an intense green staining was observed in confluent myoblasts (Fig. 9b), fusing myoblasts and myotubes (Fig. 9c). In all cases, in the absence of the primary antibody, no fluorescence was detected (inserts Fig. 9b, c). Antithrombin III or SERPINC1 is therefore expressed only when thrombin must be fully inactivated to allow the myoblast-myotube transition. Despite the common properties shared by protease nexin I (PN-I) and AT-III, the former does not cross-react immunologically with the latter [22].

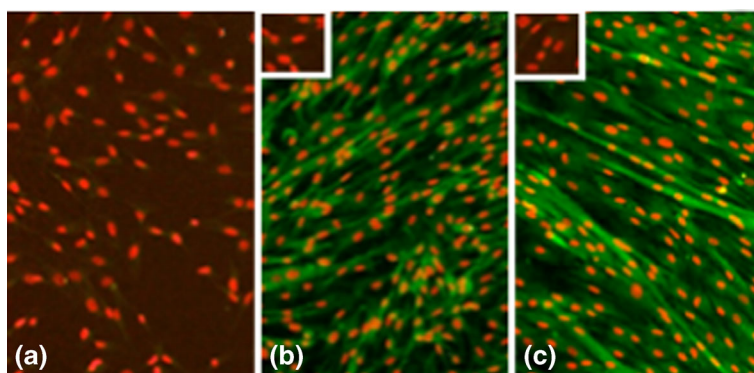


Fig. 9 Immunolocalization of AT-III in differentiating primary bovine myoblast in culture. **a** Proliferating myoblasts, **b** confluent myoblasts, **c** growing myotubes. Cell nuclei are stained in red with the Hoechst method [62]. Inserts in **b** and **c** are control samples in which the primary antibody was omitted. Immunolocalization was performed using a rabbit polyclonal AT-III (1/50) as the primary antibody and the FITC-labeled goat anti-rabbit IgG as the secondary antibody (1/500)

Hence, it can be ascertained that the labeled protein in the myoblast culture is AT-III and not PN-I.

Evidence of Post-mortem Synapse Degradation

Synapse remodeling and dismantling are the first thrombin functions identified. Post-mortem, it is well known that low voltage electrical stimulation can be applied only during the survival of the nervous system which is used for current propagation. In cattle, this is generally applied just after bleeding on undressed carcasses between 10 and 60 min after slaughter [84]. Even during this early post-mortem period, the efficiency of this technology in terms of extent of pH drop decreases sharply [37, 66]. One possible reason could be the alteration of the nerve plate by thrombin which is probably activated as soon as phosphatidylserine groups are externalized in the few minutes following animal death [4, 67].

Discussion—Conclusion—Future Prospects

Serine proteases were for a long time an enigma in meat science [63, 80]. These included proteasome [61], which also exhibits activities of the serine protease type. This proteolytic complex was shown to reproduce changes occurring in post-mortem muscle and could contribute significantly to intracellular protein degradation and, hence, to meat tenderization [18]. Whether knowledge about the proteasome grew very fast in the next years, for other serine proteases, many things were much less clear.

In the 1980s, serine proteases were first considered as only located in the extracellular matrix within the mast cells. As a result, it was suggested that they have no function in the meat tenderizing process. Later on, several reports suggested that some of them are located within muscle cells [87]. Concomitantly, Stauber and co-workers localized serine proteases inhibitors within muscle cells [88]. In 1986, we fractionated a series of inhibitors with a high affinity towards diverse serine proteases and located them within muscle cells [64]. It was then clear that muscle cells contain serine proteases together with their inhibitors and this was strengthened by the subsequent identification of some of them at the gene, transcripts, or protein levels [80].

The present review provides some answers to the numerous questions about serine proteases and their inhibitors. The high Mr fractions thus comprised predominantly cross-class inhibitory serpins able to inhibit serine and cysteine proteases and more specially caspases, a group of cysteine proteases orchestrating the demolition phase of apoptosis [94]. Taken together, these investigations suggest that, very likely, it exists a degree of compensation and redundancy within this serpin superfamily wholly comparable to that reported for the set of caspases identified so far [25]. The high Mr Fractions also contain AT-III, another serpin strongly inhibiting thrombin in a heparin dependent manner and trypsin. All these proteases have essential functions in the apoptotic process, thrombin contributing to isolate the dying cells from the nervous system, and caspases targeting several hundreds of proteins and primarily proteins from the cytoskeleton including actin of the transversal filaments, integrin to which transversal filaments of the M line bind dystrophin, a protein of the sarcoglycan complex designed costamere to which transversal filaments of the Z-line are bound, laminins, a group of proteins ensuring the connection of costameres and integrins to the extracellular matrix, ...and others.

Otherwise, we recently hypothesized that after death, muscle cells will engage in the cell death program, with apoptosis rather than necrosis being the most probable process [36, 66]. This hypothesis was confirmed more recently by numerous studies [4, 49, 67], providing evidence of cell shrinkage starting few minutes after animal death. Also they revealed concomitant rapid actin degradation, a major protein of the transversal cytoskeletal filaments binding to the costameres and to the integrins. These two findings both support the onset of apoptosis immediately after animal death. The observation of a caspase 3/serpin complex in muscle extracts definitely ascertains that caspase 3 is totally active in post-mortem muscle excised within 1 h after death and, consequently, those muscle cells are already engaged in apoptosis. We also must keep in mind that apoptotic cell dismantling implicates not only caspases but a large set of other proteases including cathepsins (autophagic process), proteasomes, and others.

However, despite the prominent progress in that domain, much remains to be done if we expect to better understand the onset and progress of apoptosis in post-mortem muscle and how the cell provide enough energy for the completion of that process. This will be a prerequisite for the identification of reliable biomarkers of meat tenderness we are looking for since years. On the other hand, protease inhibitors are of essential help for any progress in this field as they provide valuable information about the proteolytic enzymes of concern and their potential role in post-mortem cell dismantling. Total screening for proteases inhibitors in muscle cells will be therefore of major importance for future developments in our understandings of post-mortem muscle proteolysis.

Acknowledgments The present project was funded by the INATAA institute, Université Frères Mentouri Constantine (Algeria) and INRA-Theix, France. Project AGL2012–32146 from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness is also fully acknowledged. A grant from the PROFAS B+ program given to M.G. is also gratefully acknowledged.

Conflict of Interest The authors declare no conflict of interest.

References

1. Akaaboune, M., Hantai, D., Smirnova, I., Lachkar, S., Kapsimali, M., Verdiere-Sahuque, M., & Festoff, B. W. (1998). Developmental regulation of the serpin, protease nexin I, localization during activity-dependent polyneuronal synapse elimination in mouse skeletal muscle. *The Journal of Comparative Neurology*, 397, 572–579.
2. Archibald, A. L., Couperwhite, S., Mellink, C. H., Lahbib-Mansais, Y., & Gellin, J. (1996). Porcine alpha-1-antitrypsin (PI): cDNA sequence, polymorphism and assignment to chromosome 7q2.4- > q2.6. *Animal Genetics*, 27, 85–89.
3. Baker, J. B., Low, D. A., Simmer, R. L., & Cunningham, D. D. (1980). Protease-nexin—a cellular-component that links thrombin and plasminogen-activator and mediates their binding to cells. *Cell*, 21, 37–45.
4. Becila, S., Herrera-Mendez, C. H., Coulis, G., Labas, R., Astruc, T., Picard, B., Boudjellal, A., Pelissier, P., Bremaud, L., & Ouali, A. (2010). Postmortem muscle cells die through apoptosis. *European Food Research and Technology*, 231, 485–493.
5. Berri, M., Venien, A., Levieux, D., & Ouali, A. (1996). Tissue distribution and characterization of a 30-kDa cysteine proteinase inhibitor from bovine skeletal muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 113, 275–279.
6. Bige, L., Ouali, A., & Valin, C. (1985). Purification and characterization of a low molecular weight cysteine proteinase inhibitor from bovine muscle. *Biochimica et Biophysica Acta*, 843, 269–275.

7. Billingsley, G. D., Walter, M. A., Hammond, G. L., & Cox, D. W. (1993). Physical mapping of four serpin genes: alpha 1-antitrypsin, alpha 1-antichymotrypsin, corticosteroid-binding globulin, and protein C inhibitor, within a 280-kb region on chromosome 14q32.1. *American Journal of Human Genetics*, 52, 343–353.
8. Blanchet, X., Pere-Brissaud, A., Duprat, N., Pinault, E., Delourme, D., Ouali, A., Combet, C., Maftah, A., Pelissier, P., & Bremaud, L. (2012). Mutagenesis of the bovSERPINA3-3 demonstrates the requirement of aspartate-371 for intermolecular interaction and formation of dimers. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 21, 977–986.
9. Boon, J. M., Lambert, T. N., Sisson, A. L., Davis, A. P., & Smith, B. D. (2003). Facilitated phosphatidylserine (PS) flip-flop and thrombin activation using a synthetic PS scramblase. *Journal of the American Chemical Society*, 125, 8195–8201.
10. Businaro, R., Nori, S. L., Toesca, A., De Renzis, G., Ortolani, F., De Santis, E., & Fumagalli, L. (1995). Immunohistochemical detection of three serum protease inhibitors in mouse skeletal muscle by confocal laser scanning microscopy. *Italian Journal of Anatomy and Embryology*, 100(Suppl 1), 123–130.
11. Chinni, C., de Niese, M. R., Tew, D. J., Jenkins, A. L., Bottomley, S. P., & Mackie, E. J. (1999). Thrombin, a survival factor for cultured myoblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 9169–9174.
12. Citron, B. A., Smirnova, I. V., Zoubine, M. N., & Festoff, B. W. (1997). Quantitative PCR analysis reveals novel expression of prothrombin mRNA and regulation of its levels in developing mouse muscle. *Thrombosis Research*, 87, 303–313.
13. Cory, S., & Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*, 2, 647–656.
14. Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116, 205–219.
15. Das, M., Sharma, R., & Mishra, V. (2012). Induction of apoptosis by ribosome inactivating proteins. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166, 1552–1561.
16. de Niese, M. R., Chinni, C., Pike, R. N., Bottomley, S. P., & Mackie, E. J. (2002). Dissection of protease-activated receptor-1-dependent and -independent responses to thrombin in skeletal myoblasts. *Experimental Cell Research*, 274, 149–156.
17. Dobo, J., Swanson, R., Salvesen, G. S., Olson, S. T., & Gettins, P. G. (2006). Cytokine response modifier a inhibition of initiator caspases results in covalent complex formation and dissociation of the caspase tetramer. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 38781–38790.
18. Dutaud, D., Aubry, L., Sentandreu, M. A., & Ouali, A. (2006). Bovine muscle 20S proteasome: I. Simple purification procedure and enzymatic characterization in relation with postmortem conditions. *Meat Science*, 74, 327–336.
19. Elliott, P. R., Pei, X. Y., Dafforn, T. R., & Lomas, D. A. (2000). Topography of a 2.0 Å structure of alpha1-antitrypsin reveals targets for rational drug design to prevent conformational disease. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 9, 1274–1281.
20. Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35, 495–516.
21. Faller, B., & Bieth, J. G. (1991). Kinetics of the interaction of chymotrypsin with eglin c. *Biochemistry Journal*, 280(Pt 1), 27–32.
22. Farrell, D. H., Van Nostrand, W. E., & Cunningham, D. D. (1986). A simple two-step purification of protease nexin. *Biochemistry Journal*, 237, 907–912.
23. Fenton, J. W. (1986). Thrombin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 485, 5–15.
24. Forsyth, S., Horvath, A., & Coughlin, P. (2003). A review and comparison of the murine alpha1-antitrypsin and alpha1-antichymotrypsin multigene clusters with the human clade A serpins. *Genomics*, 81, 336–345.
25. Fuentes-Prior, P., & Salvesen, G. S. (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochemical Journal*, 384, 201–232.
26. Fulda, S., & Vucic, D. (2012). Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11, 109–124.
27. Gagaoua, M., Boudida, Y., Becila, S., Picard, B., Boudjellal, A., Sentandreu, M. A., & Ouali, A. (2012). New caspases' inhibitors belonging to the serpin superfamily: a novel key control point of apoptosis in mammalian tissues. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 03, 740–750.
28. Gagaoua, M., Boudjellal, A., Becila, S., Boudida, Y., Herrera-Mendez, C. H., Sentandreu, M. A., & Ouali, A. (2013). Apoptosis regulation in postmortem muscle: Cross-class inhibition of caspases by two bovine serpins. *Proceedings of the 59th International Congress of Meat Science and Technology*, pp. 4. Izmir, Turkey.
29. Gagaoua, M., Durand, D., Micol, D., Santé-Lhoutellier, V., Terlouw, C., Ellies-Oury, M. P., Boudjellal, A., Hocquette, J. F., & Picard, B. (2014). Biomarkers of meat sensory qualities of Angus beef breed: towards the development of prediction equations. 15èmes JSMTV, pp. 137–138. Viandes & Produits Carnés, Clermont-Ferrand.
30. Gettins, P. G. (2002). Serpin structure, mechanism, and function. *Chemical Reviews*, 102, 4751–4804.

31. Gettins, P. G. (2007). *Mechanisms of serpin inhibition. Molecular and cellular aspects of the serpinopathies and disorders in serpin activity* (pp. 67–100). New Jersey: World Scientific.
32. Glazner, G. W., Yadav, K., Fitzgerald, S., Coven, E., Brennenman, D. E., & Nelson, P. G. (1997). Cholinergic stimulation increases thrombin activity and gene expression in cultured mouse muscle. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 99, 148–154.
33. Guttridge, D. C., Lau, A., Tran, L., & Cunningham, D. D. (1997). Thrombin causes a marked delay in skeletal myogenesis that correlates with the delayed expression of myogenin and p21CIP1/WAF1. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 24117–24120.
34. Hardwick, J. M., & Soane, L. (2013). Multiple functions of BCL-2 family proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5.
35. Herrera-Mendez, C. H., Becila, S., Blanchet, X., Pelissier, P., Delourme, D., Coulis, G., Sentandreu, M. A., Boudjellal, A., Bremaud, L., & Ouali, A. (2009). Inhibition of human initiator caspase 8 and effector caspase 3 by cross-class inhibitory bovSERPINA3-1 and A3-3. *FEBS Letters*, 583, 2743–2748.
36. Herrera-Mendez, C. H., Becila, S., Boudjellal, A., & Ouali, A. (2006). Meat ageing : reconsideration of the current concept. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 394–405.
37. Herrera-Mendez, C. H., Becila, S., Coulis, G., Sentandreu, M. A., Aubry, L., & Ouali, A. (2010). Purification and partial characterization of antithrombin III from bovine skeletal muscle and possible role of thrombin in postmortem apoptosis development and in efficiency of low voltage electrical stimulation. *Food Research International*, 43, 356–363.
38. Herrera-Mendez, C. H., Bremaud, L., Coulis, G., Pelissier, P., Sentandreu, M. A., Aubry, L., Delourme, D., Chambon, C., Maftah, A., Levezil, H., & Ouali, A. (2006). Purification of the skeletal muscle protein Endopin 1B and characterization of the genes encoding Endopin 1A and 1B isoforms. *FEBS Letters*, 580, 3477–3484.
39. Herrera Mendez, C. (2006). Marqueurs biologiques de la qualité de la viande bovine: purification, caractérisation et quantification de trois serpins musculaires. Clermont-Ferrand 2.
40. Horvath, A. J., Forsyth, S. L., & Coughlin, P. B. (2004). Expression patterns of murine antichymotrypsin-like genes reflect evolutionary divergence at the serpin3 locus. *Journal of Molecular Evolution*, 59, 488–497.
41. Horvath, A. J., Lu, B. G., Pike, R. N., & Bottomley, S. P. (2011). Methods to measure the kinetics of protease inhibition by serpins. *Methods in Enzymology*, 501, 223–235.
42. Huntington, J. A. (2011). Serpin structure, function and dysfunction. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9, 26–34.
43. Huntington, J. A., Read, R. J., & Carrell, R. W. (2000). Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature*, 407, 923–926.
44. Irving, J. A., Pike, R. N., Lesk, A. M., & Whistock, J. C. (2000). Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome Research*, 10, 1845–1864.
45. Ishida, N., Yamashita, M., Koizumi, N., Terayama, M., Ineno, T., & Minami, T. (2003). Inhibition of post-mortem muscle softening following in situ perfusion of protease inhibitors in tilapia. *Fisheries Science*, 69, 632–638.
46. Kale, J., Chi, X., Leber, B., & Andrews, D. (2014). Examining the molecular mechanism of bcl-2 family proteins at membranes by fluorescence spectroscopy. *Methods in Enzymology*, 544, 1–23.
47. Kataoka, T., Schroter, M., Hahne, M., Schneider, P., Irmeler, M., Thome, M., Froelich, C. J., & Tschoep, J. (1998). FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161, 3936–3942.
48. Kelvin, D. J., Simard, G., Sue, A. Q. A., & Connolly, J. A. (1989). Growth factors, signaling pathways, and the regulation of proliferation and differentiation in BC3H1 muscle cells. II. Two signaling pathways distinguished by pertussis toxin and a potential role for the ras oncogene. *The Journal of Cell Biology*, 108, 169–176.
49. Kemp, C. M., & Parr, T. (2012). Advances in apoptotic mediated proteolysis in meat tenderisation. *Meat Science*, 92, 252–259.
50. Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., & Peter, M. E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO Journal*, 14, 5579–5588.
51. Komiya, T., Ray, C. A., Pickup, D. J., Howard, A. D., Thornberry, N. A., Peterson, E. P., & Salvesen, G. (1994). Inhibition of interleukin-1 beta converting enzyme by the cowpox virus serpin CrmA. An example of cross-class inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 19331–19337.
52. Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T. J., Kirschner, M. W., Koths, K., Kwiatkowski, D. J., & Williams, L. T. (1997). Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*, 278, 294–298.

53. Li, P., Nijhawan, D., & Wang, X. (2004). Mitochondrial activation of apoptosis. *Cell*, 116, S57–S59. 52 p following S59.
54. Liu, Y., Fields, R. D., Festoff, B. W., & Nelson, P. G. (1994). Proteolytic action of thrombin is required for electrical activity-dependent synapse reduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91, 10300–10304.
55. Mann, K. G. (1999). Biochemistry and physiology of blood coagulation. *Thrombosis and Haemostasis*, 82, 165–174.
56. Mbebi, C., Hantai, D., Jandrot-Perrus, M., Doyennette, M. A., & Verdiere-Sahuque, M. (1999). Protease nexin I expression is up-regulated in human skeletal muscle by injury-related factors. *Journal of Cellular Physiology*, 179, 305–314.
57. Miller, M. F., Carr, M. A., Ramsey, C. B., Crockett, K. L., & Hoover, L. C. (2001). Consumer thresholds for establishing the value of beef tenderness. *Journal of Animal Science*, 79, 3062–3068.
58. Musilova, P., Lahbib-Mansais, Y., Yerle, M., Cepica, S., Stratil, A., Coppieters, W., & Rubes, J. (1995). Assignment of pig alpha 1-antichymotrypsin (AACT or P12) gene to chromosome region 7q23-q26. *Mammalian Genome*, 6, 445.
59. Nicholson, D. W. (2000). From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature*, 407, 810–816.
60. Olson, S. T., & Gettins, P. G. (2011). Regulation of proteases by protein inhibitors of the serpin superfamily. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 99, 185–240.
61. Orlowski, M., & Wilk, S. (1981). A multicatalytic protease complex from pituitary that forms enkephalin and enkephalin containing peptides. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 101, 814–822.
62. Ormerod, M. G. (1997). Analysis of cell proliferation using the bromodeoxyuridine/Hoechst-ethidium bromide method. *Methods in Molecular Biology*, 75, 357–365.
63. Ouali, A. (1990). Meat tenderization: possible causes and mechanisms. A review. *Journal of Muscle Foods*, 1, 129–165.
64. Ouali, A., Bige, L., Obled, A., Lacourt, A., & Valin, C. (1986). Small and high molecular weight protease inhibitors from bovine skeletal muscle. In V. Turk (Ed.), *Cysteine proteinases and their inhibitors* (pp. 545–554). Berlin: Walter de Gruyter and Co.
65. Ouali, A., Gagaoua, M., Boudida, Y., Becila, S., Boudjellal, A., Herrera-Mendez, C. H., & Sentandreu, M. A. (2013). Biomarkers of meat tenderness: present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanisms involved. *Meat Science*, 95, 854–870.
66. Ouali, A., Herrera-Mendez, C. H., Coulis, G., Becila, S., Boudjellal, A., Aubry, L., & Sentandreu, M. A. (2006). Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Science*, 74, 44–58.
67. Ouali, A., Herrera-Mendez, C. H., Coulis, G., Samira, B., Boudjellal, A., Harhoura, K., Aubry, L., & Sentandreu, M. A. (2007). Meat tenderisation and muscle cell death, two highly related events. *Tehnologija Mesa*, 48, 1–15.
68. Ouali, A., Rouchon, P., Zabari, M., Berri, M., Zamora, F., & Tassy, C. (1995). Natural serine and cysteine proteinase inhibitors in bovine skeletal muscle. In A. Ouali, D. Demeyer, & F. J. M. Smulders (Eds.), *Expression of tissue proteinases and regulation of protein degradation as related to meat quality* (pp. 173–198). Utrecht: ECCEAMST.
69. Ouali, A., & Talmant, A. (1990). Calpains and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal muscles. *Meat Science*, 28, 331–348.
70. Pejler, G., Abrink, M., Ringvall, M., & Wernersson, S. (2007). Mast cell proteases. *Advances in Immunology*, 95, 167–255.
71. Pelissier, P., Delourme, D., Germot, A., Blanchet, X., Becila, S., Maftah, A., Leveziel, H., Ouali, A., & Bremaud, L. (2008). An original SERPINA3 gene cluster: elucidation of genomic organization and gene expression in the Bos taurus 21q24 region. *BMC Genomics*, 9, 151.
72. Picard, B., Gagaoua, M., Micol, D., Cassar-Malek, I., Hocquette, J. F., & Terlouw, C. E. (2014). Inverse relationships between biomarkers and beef tenderness according to contractile and metabolic properties of the muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 9808–9818.
73. Rawlings, N. D., Tolle, D. P., & Barrett, A. J. (2004). Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochemical Journal*, 378, 705–716.
74. Rosenberg, R. D., & Damus, P. S. (1973). The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor. *Journal of Biological Chemistry*, 248, 6490–6505.
75. Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G., & Vandenabeele, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, 23, 2861–2874.
76. Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P. H., & Peter, M. E. (1999). The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 1541–1548.
77. Schechter, N. M., & Plotnick, M. I. (2004). Measurement of the kinetic parameters mediating protease-serpin inhibition. *Methods*, 32, 159–168.

78. Schick, C., Brömme, D., Bartuski, A. J., Uemura, Y., Schechter, N. M., & Silverman, G. A. (1998). The reactive site loop of the serpin SCCA1 is essential for cysteine proteinase inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 13465–13470.
79. Schick, C., Pemberton, P. A., Shi, G. P., Kamachi, Y., Cataltepe, S., Bartuski, A. J., Gornstein, E. R., Bromme, D., Chapman, H. A., & Silverman, G. A. (1998). Cross-class inhibition of the cysteine proteinases cathepsins K, L, and S by the serpin squamous cell carcinoma antigen 1: a kinetic analysis. *Biochemistry*, 37, 5258–5266.
80. Sentandreu, M. A., Coulis, G., & Ouali, A. (2002). Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends in Food Science and Technology*, 13, 400–421.
81. Shackelford, S. D., Koohmaraie, M., Miller, M. F., Crouse, J. D., & Reagan, J. O. (1991). An evaluation of tenderness of the longissimus muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. *Journal of Animal Science*, 69, 171–177.
82. Shamas-Din, A., Kale, J., Leber, B., & Andrews, D. W. (2013). Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5, a008714.
83. Silverman, G. A., Bird, P. I., Carrell, R. W., Church, F. C., Coughlin, P. B., Gettins, P. G. W., Irving, J. A., Lomas, D. A., Luke, C. J., Moyer, R. W., Pemberton, P. A., Remold-O'Donnell, E., Salvesen, G. S., Travis, J., & Whisstock, J. C. (2001). The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 33293.
84. Simmons, N. J., Daly, C. C., Cummings, T. L., Morgan, S. K., Johnson, N. V., & Lombard, A. (2008). Reassessing the principles of electrical stimulation. *Meat Science*, 80, 110–122.
85. Singh, P., Tiwari, A., Rajmani, R. S., Kumar, G. R., Chaturvedi, U., Saxena, L., Saxena, S., Doley, J., Sahoo, A., Santra, L., Saxena, M., Kumar, S., & Sharma, B. (2015). Apoptin as a potential viral gene oncotherapeutic agent. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176, 196–212.
86. Slee, E. A., Adrain, C., & Martin, S. J. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 7320–7326.
87. Stauber, W. T., Fritz, V., Dahlmann, B., & Reinauer, H. (1983). Immunohistochemical localization of two proteinases in skeletal muscle. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 31, 827–830.
88. Stauber, W. T., Ong, S. H., Fritz, V. K., Esnard, F., & Gauthier, F. (1983). Protease inhibitor localization in control and streptozotocin-diabetic skeletal muscles. *The Histochemical Journal*, 15, 1079–1086.
89. Suidan, H. S., Niclou, S. P., Dreesen, J., Beltraminelli, N., & Monard, D. (1996). The thrombin receptor is present in myoblasts and its expression is repressed upon fusion. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 29162–29169.
90. Swanson, R., Raghavendra, M. P., Zhang, W. Q., Froelich, C., Gettins, P. G. W., & Olson, S. T. (2007). Serine and cysteine proteases are translocated to similar extents upon formation of covalent complexes with serpins—fluorescence perturbation and fluorescence resonance energy transfer mapping of the protease binding site in CrmA complexes with granzyme B and caspase-1. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 2305–2313.
91. Takeda, A., Yamamoto, T., Nakamura, Y., Takahashi, T., & Hibino, T. (1995). Squamous cell carcinoma antigen is a potent inhibitor of cysteine proteinase cathepsin L. *FEBS Letters*, 359, 78–80.
92. Tassy, C. (1998). Purification et caractérisation d'un inhibiteur de sérine protéinases à partir de muscle squelettique de bovin. PhD Thesis, EPHE, Paris.
93. Tassy, C., Herrera-Mendez, C. H., Sentandreu, M. A., Aubry, L., Bremaud, L., Pelissier, P., Delourme, D., Brillard, M., Gauthier, F., Leveziel, H., & Ouali, A. (2005). Muscle endopin 1, a muscle intracellular serpin which strongly inhibits elastase: purification, characterization, cellular localization and tissue distribution. *Biochemical Journal*, 388, 273–280.
94. Taylor, R. C., Cullen, S. P., & Martin, S. J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 231–241.
95. Walker, N. P., Talanian, R. V., Brady, K. D., Dang, L. C., Bump, N. J., Ferenz, C. R., Franklin, S., Ghayur, T., Hackett, M. C., Hammill, L. D., et al. (1994). Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell*, 78, 343–352.
96. Wang, N., Xu, H.-L., Zhao, X., Wen, X., Wang, F.-T., Wang, S.-Y., Fu, L.-L., Liu, B., & Bao, J.-K. (2012). Network-based identification of novel connections among apoptotic signaling pathways in cancer. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167, 621–631.
97. Wilson, K. P., Black, J. A., Thomson, J. A., Kim, E. E., Griffith, J. P., Navia, M. A., Murcko, M. A., Chambers, S. P., Aldape, R. A., Raybuck, S. A., et al. (1994). Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature*, 370, 270–275.

98. Ye, S., Cech, A. L., Belmares, R., Bergstrom, R. C., Tong, Y., Corey, D. R., Kanost, M. R., & Goldsmith, E. J. (2001). The structure of a Michaelis serpin-protease complex. *Nature Structural Biology*, 8, 979–983.
99. Zamora, F., Aubry, L., Sayd, T., Lepetit, J., Lebert, A., Sentandreu, M. A., & Ouali, A. (2005). Serine peptidase inhibitors, the best predictor of beef ageing amongst a large set of quantitative variables. *Meat Science*, 71, 730–742.
100. Zamora, F., Debiton, E., Lepetit, J., Lebert, A., Dransfield, E., & Ouali, A. (1996). Predicting variability of ageing and toughness in beef M. Longissimus lumborum et thoracis. *Meat Science*, 43, 321–333.
101. Zoubine, M. N., Ma, J. Y., Smimova, I. V., Citron, B. A., & Festoff, B. W. (1996). A molecular mechanism for synapse elimination: novel inhibition of locally generated thrombin delays synapse loss in neonatal mouse muscle. *Developmental Biology*, 179, 447–457.

La Bov-SERPINA3 comme biomarqueur de la viande bovine

Publication n° 07 (en préparation)**Differences in the levels of bov-SERPINA3 inhibitors in beef steaks from the *Rectus abdominis* muscle with high or low shear force explain the variability in tenderness of Maine-Anjou breed****M. Gagaoua, *et al.****Article en préparation*

Résumé du travail sur les serpines bovines en cours

Faute de manque de temps, cette partie de thèse visant à intégrer les serpines, en particulier la Bov-SERPINA3 dans la liste des biomarqueurs, n'a pas été achevée. Néanmoins, j'ai préféré donner dans ce qui suit la démarche entreprise pour cette partie à laquelle je tiens fort afin de i) révéler des biomarqueurs de la tendreté par stratégie protéomique sur le muscle *Rectus abdominis* des vaches laitières de réforme de la race Maine Anjou (**Figure 01**) et ii) quantifier la Bov-SERPINA3 sur des lots de tendreté (T) extrêmes (supérieure (T+) *versus* inférieure (T-)) par Western-Blot sur des gels d'électrophorèse mono et bidimensionnelle et Dot-Blot. Cette quantification permettra de valider la protéine ou un de ces isoformes comme biomarqueur(s) de tendreté et l'intégrer par la suite dans la liste des 21 biomarqueurs.



Figure 01. Photographie de la race Maine Anjou.

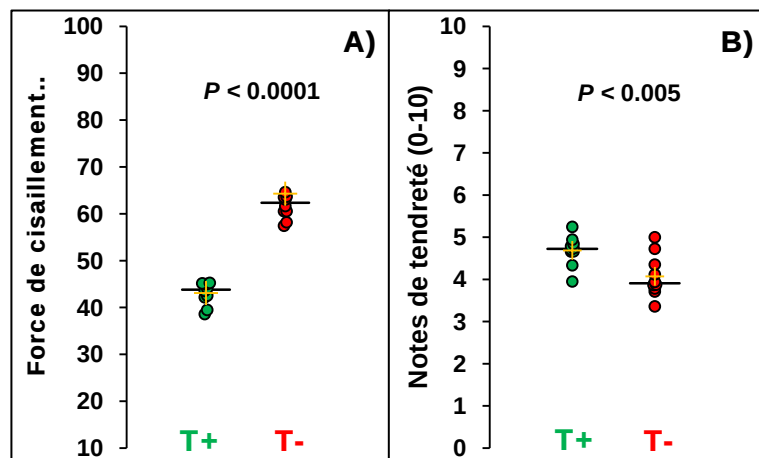


Figure 02. Boîtes à moustaches des valeurs des (a) forces de cisaillement et (b) notes de tendreté sensorielle

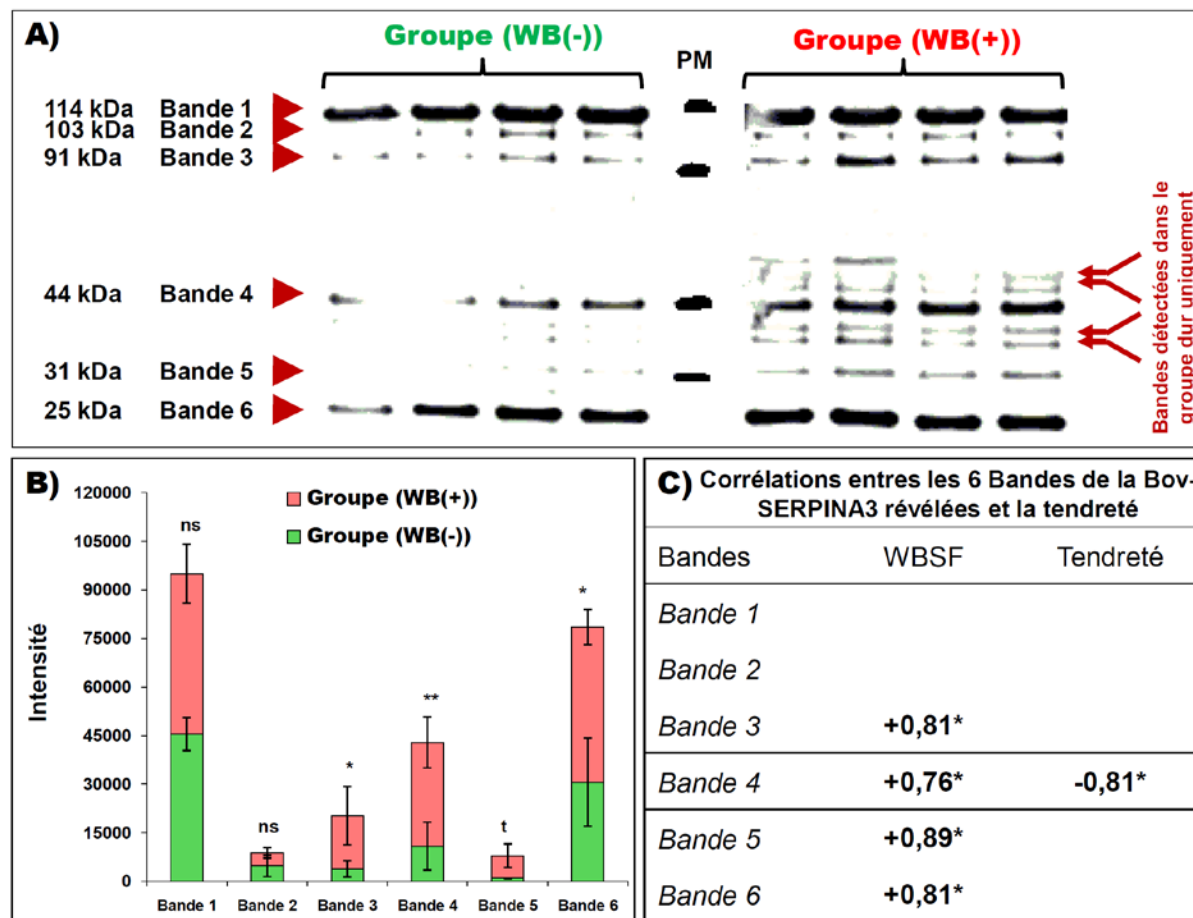


Figure 03. Révélation de la Bov-SERPINA3 et quantification par Western-Blot. **A)** résultat du Western-Blot sur les deux groupes de tendreté étudiés (n=4) et bandes majoritaires identifiées et quantifiées par l'outil Un-Scan-IT Gel 6.5 ; **B)** comparaison des abondances par analyse de variances entre les deux groupes pour les 6 bandes majoritaires ; **C)** Corrélations de Spearman entre les 6 bandes de la Bov-SERPINA3 et la tendreté (force de cisaillement (WBSF) et tendreté sensorielle).

Après abattage et à 24h *post-mortem* le muscle *Rectus abdominis* a été prélevé au même endroit de chaque carcasse des 48 animaux étudiés. Un steak de 3 cm d'épaisseur a été prélevé et mis sous vide, maturé à 14 jours à +4°C puis congelé à -20°C pour la mesure de la force de cisaillement de Warner Bratzler (WB) et l'analyse sensorielle. La mesure de force de cisaillement ainsi que l'analyse sensorielle (à 55°C) ont été effectuées suivant les protocoles donnés dans la partie méthodologie de cette thèse. Des prélèvements pour les analyses biochimiques (extraction des protéines et quantification des biomarqueurs) ont été aussi réalisés comme indiqué dans la partie méthodologie de cette thèse.

Sur la base des valeurs de la force de cisaillement (WB) et des notes de tendreté attribuées par les 12 panélistes du jury, une classification hiérarchique (« clustering ») a été effectuée pour identifier les extrêmes sur la base de la tendreté. Cette démarche m'a permis d'obtenir deux groupes de 10 animaux chacun à savoir le « groupe tendre (T+) » et « groupe dur (T-) ». Les moyennes des deux groupes pour la tendreté sensorielle et la force de cisaillement sont hautement significatives ($P < 0.01$) comme indiqué dans la Figure 02.

Sur la base de ces résultats, des analyses de protéomique d'une part et une quantification de la Bov-SERPINA3 par Western-Blot d'autre part, ont été effectuées. Afin de révéler la présence de la Bov-SERPINA3 dans les échantillons de muscle étudiés, un anticorps polyclonal a été utilisé ([Gagaoua, 2011](#)). L'anticorps permet de révéler la SERPINA3 bovine sous ces différentes formes (native ou polymérisée). Dans un premier temps, 4 animaux très durs et très tendres du groupe T- et T+ respectivement ont été sélectionnés. Les résultats du Western-Blot indiquent une multitude de formes de la Bov-SERPINA3 et une dominance dans le groupe WB+ (force de cisaillement élevée) comme le montre la Figure 03.

Ces résultats préliminaires plaident pour une surabondance des inhibiteurs de la Bov-SERPINA3 dans le groupe des animaux durs et une sous-abondance dans le groupe des animaux tendres. Néanmoins, ce n'est pas l'ensemble des bandes protéiques qui sont concernées. Les résultats indiquent que les deux premières bandes (1 et 2) à haut poids moléculaire (Bande 1 = 114 kDa et Bande 2 = 103 kDa) ne sont pas différentes entre les deux groupes. Ces dernières qui peuvent être des dimers ou polymères de la serpine ([Herrera-Mendez et al., 2009](#)) issues suite à un clivage enzymatique ou tout simplement par polymérisation, une des particularités des serpinines ([Olson et Gettins, 2011](#)). Par ailleurs, la bande n°4 à 44 kDa est d'une importance capitale vu qu'elle est à la fois corrélée avec la tendreté sensorielle (négativement) et les valeurs de la de WB (positivement) (Figure 3c).

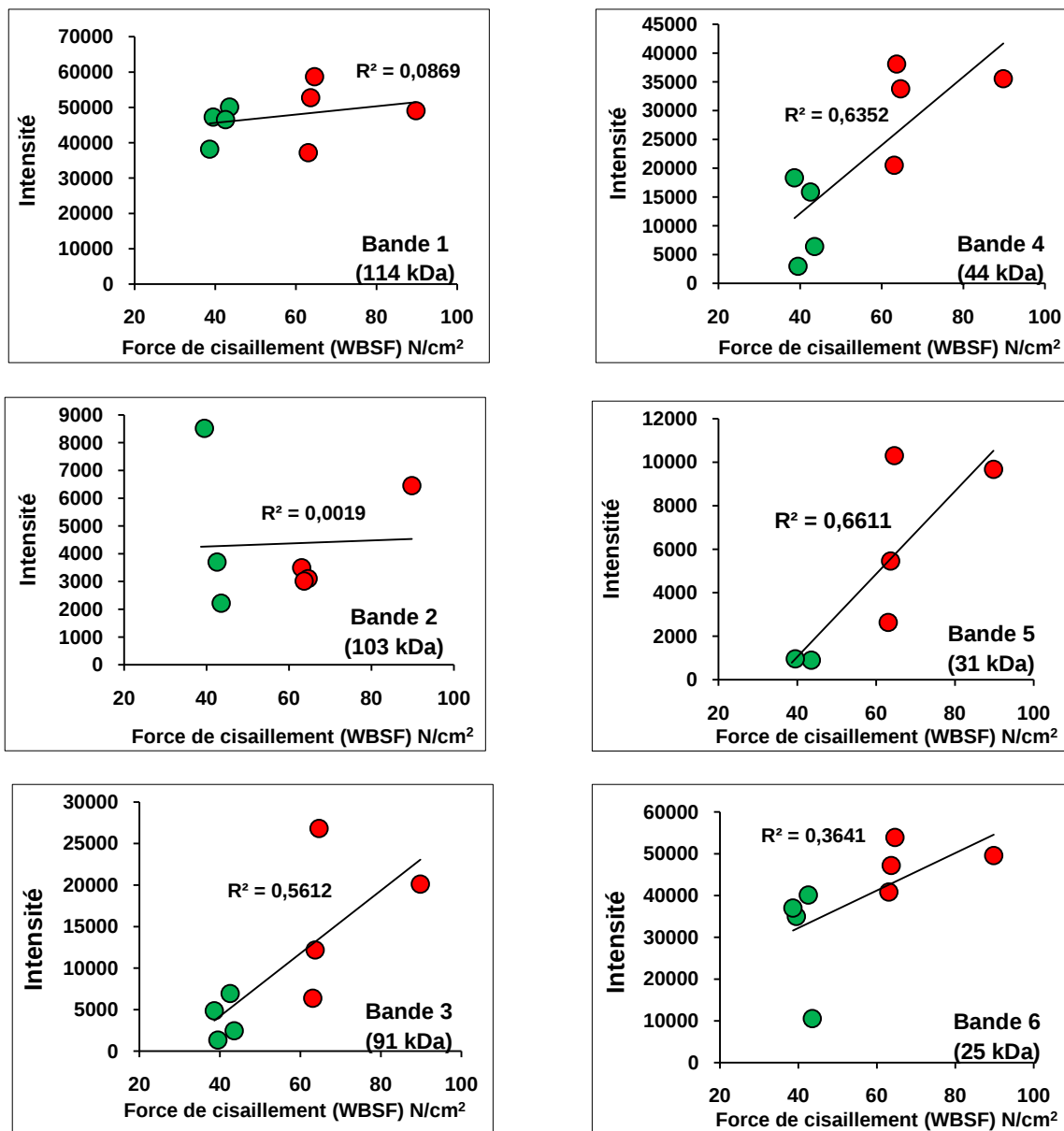


Figure 04. Corrélations entre les 6 bandes de la Bov-SERPINA3 révélées pour les deux groupes (groupe dur (cercles rouges) et tendre (cercles verts) avec les valeurs de la force de cisaillement WB.

Tableau 1. Comparaison de quelques spots du gel 2DE différemment exprimés entre les deux groupes de tendreté supérieure (WB-) et inférieure (WB+) issus de l'analyse préliminaire par l'outil SampSpots.

Direction	N° Spot	Anova (p)	Rapport ¹
Tendre > Dur	1652	1,1E-07	4,1
Tendre > Dur	1721	6,4E-06	2,0
Tendre > Dur	1650	1,5E-05	1,6
Tendre > Dur	1515	1,3E-03	1,4
Tendre > Dur	1437	1,6E-03	1,3
Dur > Tendre	753	6,4E-04	1,5
Dur > Tendre	757	8,4E-04	1,4
Dur > Tendre	502	1,2E-03	1,4
Dur > Tendre	1403	1,3E-03	1,3
Dur > Tendre	1395	2,7E-03	1,3

¹ Les taux de changement des abondances des protéines entre les deux groupes ont été donnés.

L'analyse des corrélations de Spearman pour toutes les bandes avec les forces de cisaillement est donnée dans la figure 04.

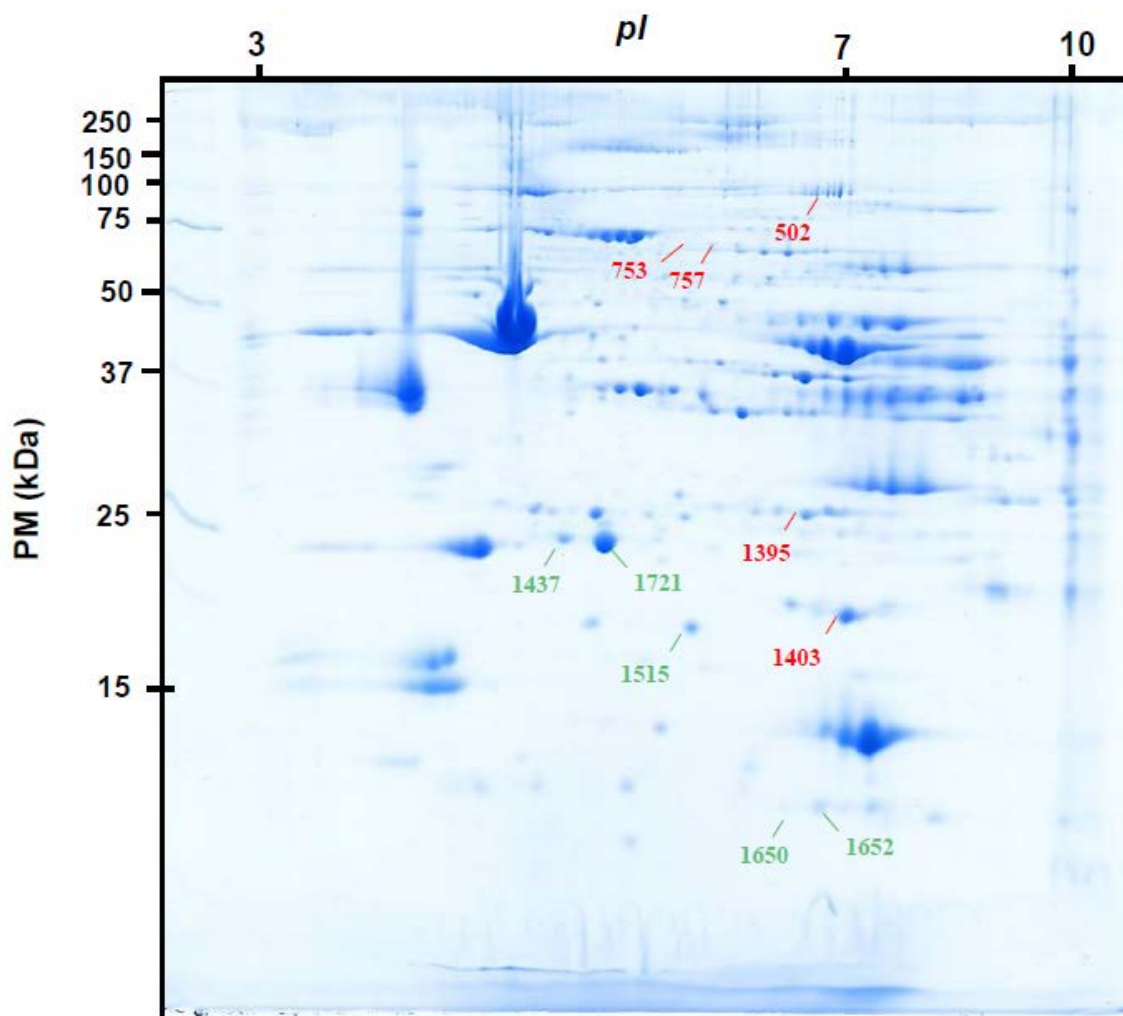
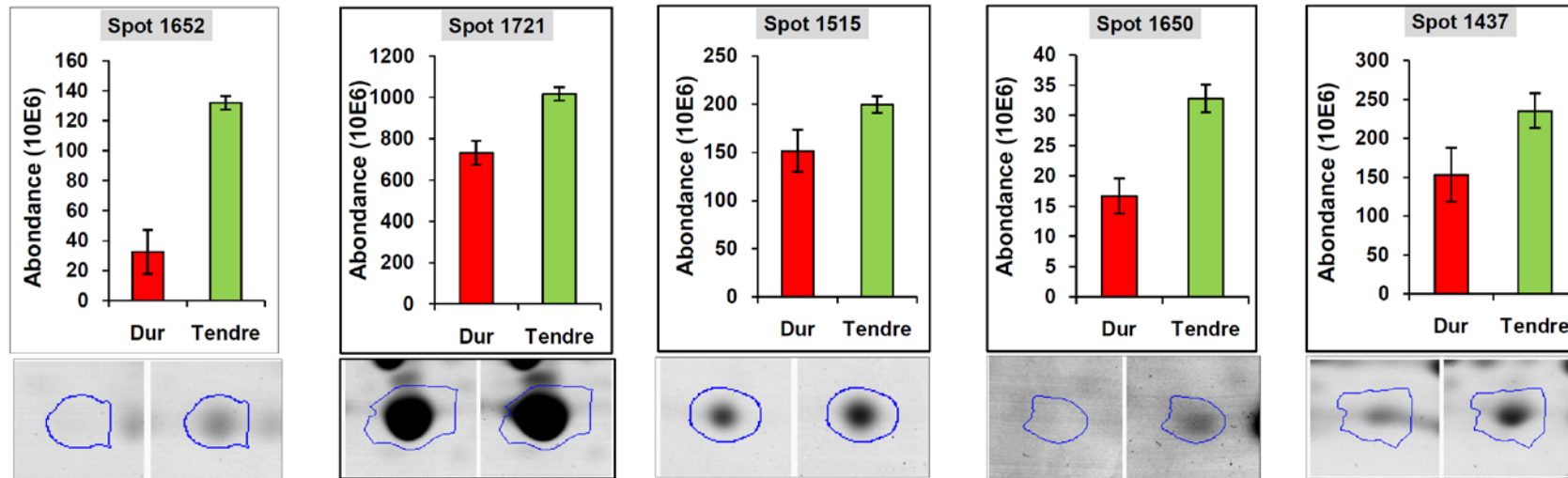


Figure 05. Gel 2DE représentatif des extraits des muscles des groupes tendres et durs. Une IPG-Strip non linéaire de 3 – 10 a été utilisée. Quelques spots protéiques significativement différents (à titre de présentation uniquement des résultats préliminaires) ont été indiqués. Les spots rouges et verts sont surexprimés chez les animaux à viande dure et tendre, respectivement.

Des gels d'électrophorèses bidimensionnels (répétition de 5 gels par groupe) ont été réalisés d'une part, pour identifier des biomarqueurs de la tendreté de la race Maine Anjou, et d'autre part, pour effectuer par la suite des Western-Blots anti-Bov-SERPINA3. Cette identification permettra de réaliser des analyses statistiques entre les protéines identifiées et les isoformes de la Bov-SERPINA3 qui peuvent être utilisés comme biomarqueurs. Le recours à l'identification de la 2DE nous permettra aussi d'effectuer des réseaux de corrélations entre les protéines identifiées et situer les rôles que la Bov-SERPINA3 peut jouer en dehors de ses activités inhibitrices de certaines protéases du muscle.

Quelques spots protéiques sous exprimés dans le groupe d'animaux WBSF(+) (dur)



Quelques spots protéiques surexprimés dans le groupe d'animaux WBSF(+) (dur)

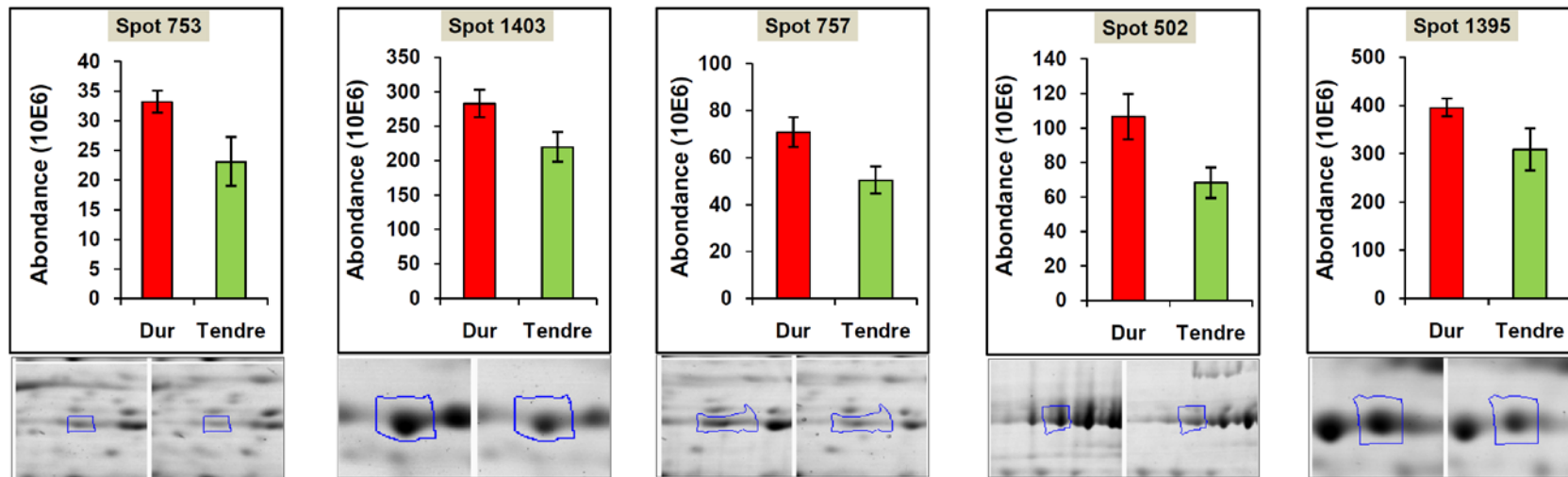


Figure 06. Comparaison de quelques spots différentiellement exprimés par analyse de variance. Il s'agit d'une présélection de spots à titre de présentation des résultats préliminaires en cours d'exploitation.

La quantification par densitométrie des différents spots protéiques révélés par coloration au bleu de Coomassie (~1400 spots protéiques) m'ont permis d'effectuer un matching (superposition et analyse) des gels représentatifs des animaux durs et tendres. Parmi les protéines identifiées différentes par l'outil SampSpot (Tableau 01), 10 spots (5 pour le groupe dur (WB+) et 5 pour le groupe tendre (WB-)) ont été présélectionnés et présentés ici à titre de présentation des résultats préliminaires. Ces spots sont issus d'une analyse de variance comparant les moyennes normalisées des volumes des spots différentiels. Aucune conclusion ne peut être prise de ces résultats et les analyses sont en cours pour une meilleure exploitation. Ce travail mérite d'être approfondi, c'est pourquoi une sélection de la liste des spots les plus discriminants sera envoyée pour identification par spectrométrie de masse.

En plus de ces résultats, des analyses de Dot-Blot sont en cours pour la quantification de la liste des 21 biomarqueurs utilisée dans ma thèse. Ces résultats et ceux de la 2DE et la 2DE couplée au Western-Blot pour l'identification ou révélation de la Bov-SERPINA3, vont nous permettre de révéler peut être de nouvelles fonctions (autre que l'activité inhibitrice) de ces serpins dans la transformation du muscle *post-mortem* en viande. De plus, cette stratégie nous permettra après analyses statistiques (réseaux de corrélations, voir **Publication n°05**) de valider certains isoformes de la Bov-SERPINA3 comme biomarqueurs de la tendreté et les intégrer dans la liste couramment utilisée. Une fois validée la Bov-SERPINA3 sera intégrée dans l'outil de puce à protéine de type RPPA (*Reverse Phase Protein Array*) pour la quantification rapide de plusieurs échantillons et biomarqueurs à la fois ([Picard et al., 2012b](#)).

Discussion générale

La qualité sensorielle de la viande bovine est un critère important d'appréciation par les consommateurs qui demeurent insatisfaits en particulier de la tendreté, le critère le plus dommageable. La synthèse bibliographique de cette thèse ainsi que l'ensemble de mes résultats rapportent que des mécanismes biologiques complexes interviennent dans la transformation *post-mortem* du muscle en viande et sont responsables du développement de nombreux critères de sa qualité. Cette thèse, en s'appuyant sur des données concernant les propriétés biologiques des muscles et les qualités sensorielles de la viande bovine s'est intéressée à ces mécanismes. En utilisant une liste de biomarqueurs de tendreté représentant plusieurs voies biologiques, le but de ma thèse était d'apporter de nouvelles connaissances sur les mécanismes gouvernant certains critères de la qualité de la viande et de proposer ainsi les premières équations de prédiction. Ma démarche expérimentale s'est appuyée sur une approche mécanistique basée sur les abondances de protéines et l'application d'analyses multivariées. Je présenterai dans cette dernière partie du manuscrit, les principaux apports scientifiques acquis au travers des différents volets de ma thèse ainsi que les atouts et les limites de ce travail avant de dégager quelques applications et perspectives.

1. Evaluation de la qualité sensorielle

Dans le but d'explorer les relations entre les attributs sensoriels d'une part et ces mêmes attributs et les caractéristiques musculaires des animaux étudiés d'autre part, une évaluation sensorielle par un jury entraîné a été effectuée. Cette dernière avait un double objectif : d'une part, caractériser les animaux par l'étude des effets de la température de cuisson et du jury de dégustation sur les notes des attributs sensoriels ; d'autre part, acquérir une expérience dans le domaine de l'analyse sensorielle de la viande en utilisant des protocoles adaptés afin d'effectuer par la suite un transfert de techniques au sein de l'équipe Maquav à l'INATAA. Ainsi, l'expérience acquise au cours de mon travail de thèse a été transférée au travers d'une valorisation des connaissances acquises et de la mise en place d'un protocole d'analyse sensorielle au sein de l'équipe pour l'évaluation de produits carnés. Ce transfert a été réalisé dans le cadre de deux encadrements de magistère que j'ai supervisés durant les années universitaires :

- 2013/2014 : Mémoire de Mlle Hiba-Ryma Boudechicha portant sur la caractérisation de *Khliia Ezir*, un produit carné traditionnel Algérien ([Boudechicha, 2014](#) ; [Boudechicha, Gagaoua et al., 2015](#)) ;

- 2014/2015 : Mémoire de Mlle Hafid Kahina portant sur la caractérisation de la viande de poules pondeuses de réformes produites en Algérie (Hafid, 2015 ; Hafid, Gagaoua *et al.*, 2015).

Sur le plan scientifique, l'évaluation sensorielle de la viande des différents types d'animaux étudiés, m'a permis de comprendre en partie les mécanismes qui orientent les préférences des consommateurs et aussi de révéler les interactions entre les attributs sensoriels. En accord avec de nombreux travaux (Cross *et al.*, 1976 ; Martens *et al.*, 1982 ; Joseph *et al.*, 1997 ; Lorenzen *et al.*, 2003 ; 2005 ; Tornberg, 2005 ; Mortensen *et al.*, 2012 ; Bowers *et al.*, 2012 ; Dubost *et al.*, 2013 ; Bejerholm *et al.*, 2014 ; Gomes *et al.*, 2014a,b), j'ai montré que quel que soit le type d'animal (7 races bovines et 3 types d'animaux) et le pays d'origine du jury, les notes de tendreté et de jutosité (texture) du muscle *Longissimus thoracis* (entrecôte) sont plus élevées à température de cuisson à cœur de 55°C qu'à 74°C. L'originalité de mon étude a été de pouvoir établir des équations de prédiction de l'appréciation (acceptabilité) globale de la viande - ou palatabilité, qui reflète le comportement ou les préférences du consommateur - sur la base des autres attributs sensoriels mesurés simultanément (**Publication n°01 et Supplément publication n°01**).

Selon Tornberg (2005), les modalités de cuisson influencent les notes de tendreté qui diminuent entre 40 et 50°C (première phase) et entre 60 et 80°C (deuxième phase), et sont plus élevées dans la phase intermédiaire de 50 à 60°C. L'augmentation de la dureté de la viande de l'ensemble des animaux étudiés à 74°C peut être associée d'une part, à la composante collagénique, par la solubilité du collagène et la contraction d'une de ses composantes, l'endomysium (Dubost *et al.*, 2013) et d'autre part, à la dénaturation des protéines de la composante myofibrillaire (actine) et leur rétrécissement. Nous supposons qu'à une température à cœur de 55°C, les lipides vont être piégés à l'intérieur du morceau de viande du fait de la formation d'une pellicule grillée à la surface, alors qu'à 74°C, les lipides sont expulsés à l'extérieur de l'échantillon avec le jus de cuisson. La viande va ainsi paraître moins juteuse à haute température de cuisson qu'à basse température. Ceci est d'autant plus juste si on admet que l'eau peut agir comme un agent plastifiant des protéines myofibrillaires. Par conséquent, les pertes en eau vont affecter les propriétés de structure en augmentant la dureté et la rigidité de la viande grillée à haute température. En conclusion, il a été suggéré de ces résultats qu'une cuisson au-delà de 55°C augmenterait simultanément l'élasticité du collagène, les pertes en eau et la dilution de la teneur en lipides intramusculaires et aurait une conséquence négative sur les notes de texture.

De plus, les résultats de cette thèse indiquent que la viande des bœufs est plus tendre et/ou plus appréciée que celle des taurillons, et celle des génisses est plutôt intermédiaire. De nombreuses études ont été conduites dans le passé. Les résultats sont souvent contradictoires et les facteurs impliqués ne sont pas encore très bien élucidés (Wulf *et al.*, 1996 ; Choat *et al.*, 2006 ; Hennessy et Morris 2003 ; Bureš et Bartoň 2012).

Mes résultats indiquent aussi que la flaveur est corrélée de la même manière que la tendreté avec les notes d'acceptabilité. Ceci est en accord avec les études antérieures rapportant que la flaveur et la tendreté ont plus d'impact sur l'acceptabilité et la qualité gustative d'une viande, que tout autre attribut sensoriel (Glitsch, 2000 ; Killinger *et al.*, 2004 ; Monson *et al.*, 2005). Mes résultats montrent aussi que les préférences des consommateurs et les notes attribuées pour la flaveur et l'appréciation globale ne sont pas exprimées de la même manière que ceux de la texture. Les notes attribuées à ces deux attributs sont plus élevées à 74°C qu'à 55°C. Ces résultats sont cohérents par rapport à ceux de la littérature qui indiquent que les précurseurs de la flaveur sont plus développés et prononcés lors de la cuisson à haute qu'à basse température. Les composés aromatiques volatils produits à partir des composés hydrosolubles et lipidiques durant la cuisson sont nombreux (Elmore et Mottram, 2009). Ces composés sont générés d'une part, par la réaction de Maillard, et d'autre part, par la dégradation des lipides. En effet, la teneur en lipides intramusculaires est un facteur primordial dans la détermination de la flaveur de la viande et de son acceptabilité après cuisson. Les lipides figurent parmi les caractéristiques musculaires qui ont été retenues dans le modèle de l'explication de l'appréciation globale indépendamment du type d'animal (**Publication n°02**) malgré le faible pouvoir d'explication de ce paramètre (voir la partie caractéristiques musculaires et qualités sensorielles ci-après). Néanmoins, il est important de préciser que le déterminisme exact de la flaveur est complexe et non totalement élucidé, notamment en raison des nombreux composés impliqués qui n'ont pas fait l'objet de caractérisation dans cette thèse.

Enfin, les modèles de régression que j'ai établis ont clairement montré que les préférences des jurys en fonction de leur origine ne s'expliquent pas par les mêmes attributs sensoriels. Mes résultats indiquent de nouvelles pistes d'investigation en se basant sur les corrélations obtenues entre les attributs évalués en fonction de la température de cuisson et l'origine des dégustateurs. Ces résultats sont d'une grande importance pour expliquer les controverses qui existent dans la littérature concernant les relations rapportées entre la tendreté et la jutosité. Face au développement des grandes surfaces (supermarchés) en Algérie,

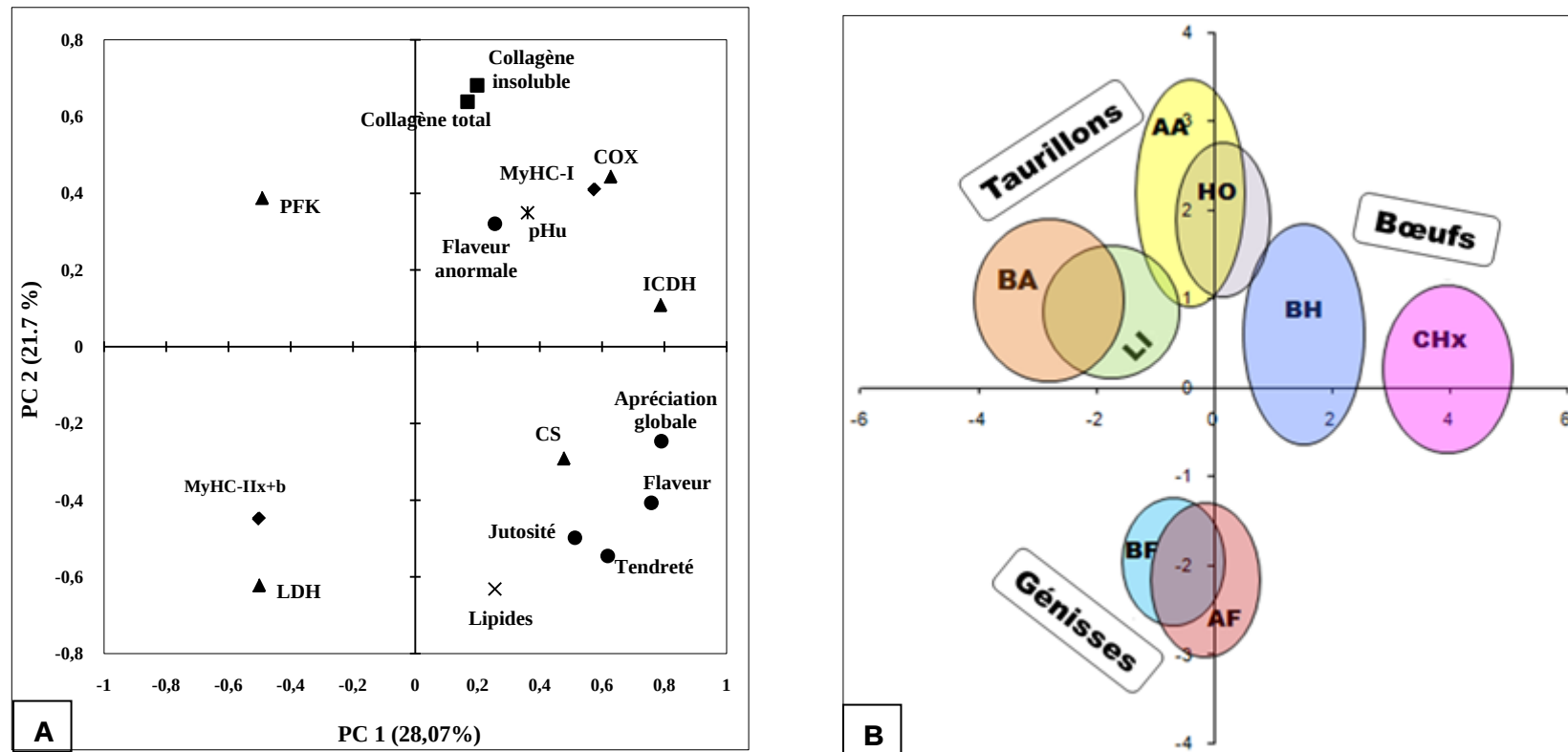


Figure 37. Analyse en composantes principales (ACP) des caractéristiques musculaires et qualités sensorielles.

A) Projection des variables utilisées: (■) collagène, (●) attributs des qualités sensorielles, (▲) caractéristiques métaboliques : enzymes glycolytiques (LDH et PFK) et oxydatives (COX, ICDH et CS), (◆) isoformes de chaîne lourdes myosines (MyHC), (x) teneur en lipides intramusculaires et (X) pHu des échantillons du muscle *Longissimus thoracis*

Abbréviations : PFK: Phosphofructokinase; LDH: Lactate déshydrogénase; ICDH: Isocitrate déshydrogénase; COX: Cytochrome c oxidase; CS: Citrate synthase; MyHC: *Myosin Heavy Chain*-I, -IIa, -IIx+IIb;.

B) Bi-plot de la distribution des types d'animaux (race & sexe) suivant les deux premiers axes de l'ACP.

Désignations des races par type animal : Génisses (AF: Aberdeen Angus x Friesian, BF: Belgian-Blue x Friesian), Taurillons (HO: Holstein, LIM: Limousin, BA: Blond d'Aquitaine, AA: Aberdeen Angus) et Bœufs (BH: Belgian-Blue x Holstein, CHx: Charolais croisé).

cette démarche mériterait d'être exploitée afin de discriminer les préférences des consommateurs selon leurs régions et de proposer des produits à qualité garantie, répondant à leurs exigences ou préférences. Ces régions qui diffèrent par leurs coutumes et habitudes alimentaires, constituent un très bon modèle d'étude pour construire les premières bases scientifiques de l'évaluation sensorielle de la viande en Algérie. Dans ce contexte, il serait intéressant de mettre en place des groupes de travail en mesure de participer à l'acquisition et au développement de nouvelles connaissances dans ce domaine et d'organiser la filière viande en vue de son adaptation et de sa modernisation.

2. Caractéristiques musculaires et qualités sensorielles

Les qualités technologiques et sensorielles des viandes sont influencées en grande partie par les caractéristiques biochimiques du muscle au moment de la mort de l'animal (Ouali *et al.*, 2006 ; 2013). Pour la viande bovine, l'étude des caractéristiques musculaires présente un intérêt fort puisque leurs propriétés sont impliquées dans le déterminisme de divers critères de la qualité de la viande tels que la tendreté, la flaveur, la couleur et le pH (Klont *et al.*, 1998 ; Maltin *et al.*, 2003).

En effet, les qualités des viandes sont le résultat de phénomènes biochimiques intracellulaires *post-mortem* dépendant des systèmes protéolytiques endogènes au muscle, mais également des phénomènes biologiques survenant dans le muscle *post-mortem* depuis les premières minutes après l'abattage (Ouali, 1990 ; Maltin *et al.*, 2003 ; Hocquette *et al.*, 2014). Ces paramètres sont eux-mêmes dépendants de l'environnement dans lequel évolue l'animal et de ses caractéristiques génétiques et musculaires. Au sein d'une même espèce, les caractéristiques des muscles peuvent varier en fonction de multiples facteurs. Cette partie de ma thèse a été réalisée sur un effectif de 265 animaux regroupant 8 races bovines réparties en 3 types d'animaux (génisses, bœufs et taurillons). Ce travail sur un effectif important de divers types de bovins m'a permis d'explorer et d'identifier les mécanismes les plus robustes et les lois générales existant d'une part, entre les différentes caractéristiques musculaires, et d'autre part, entre ces dernières et les qualités sensorielles de la viande bovine.

En effet, l'étude de plusieurs races analysées dans le même dispositif expérimental du projet européen ProSafeBeef, m'a permis de montrer les divergences qui existent entre les races et types d'animaux. Dans leur globalité, les caractéristiques du muscle *Longissimus thoracis* (entrecôte) étudiées, discriminent les groupes d'animaux (Figure 37). Un résultat majeur de cette étude est l'identification d'une relation robuste (retrouvée quel que soit le type

d'animal) entre l'activité de l'enzyme isocitrate déshydrogénase (ICDH) et les proportions de chaînes lourdes de myosine lente (MyHC-I). Ainsi, ces deux protéines sont proposées pour classer les animaux selon leurs propriétés contractiles et métaboliques quel que soit le type de bovin considéré. Les autres composantes musculaires sont très différentes entre les types d'animaux.

Dans cette thèse, aucune caractéristique musculaire n'a été trouvée corrélée avec les qualités sensorielles évaluées. Les équations de prédiction (tout animal confondu) ont permis d'expliquer au mieux 4,8% et 7,2% de la variabilité de la tendreté et de l'appréciation globale, respectivement. Considérés par type d'animal, mes modèles expliquent jusqu'à 27,8% et 39,5% de la variabilité de la tendreté et de l'appréciation globale des bœufs ce qui est en accord avec les données bibliographiques. Plusieurs auteurs ont montré que les caractéristiques biochimiques du muscle expliquent au plus 30% des variations de la tendreté chez certaines races bovines (Keith *et al.*, 1985 ; Renand *et al.*, 2001 ; Chriki *et al.*, 2012 ; Bonny *et al.*, 2015). En plus des caractéristiques liées à l'animal, il serait intéressant d'intégrer dans la prédiction des qualités, des données concernant sa conduite et également des données sur les traitements technologiques *post-mortem* tels que les durées de maturation et les méthodes de cuisson de la viande afin de dégager plus de conclusions.

Un autre paramètre important de la composante musculaire mérite d'être discuté. Une forte corrélation positive ($r = 0.87$, $P < 0.001$) a été trouvée comme attendue, entre le collagène total et insoluble, mais ils ne sont pas corrélés avec les qualités sensorielles. Par contre, le collagène total rentre négativement dans les modèles de l'appréciation globale des bœufs et des génisses et explique de 4 à 5,4% de la variabilité. L'effet modéré du collagène dans cette thèse peut être dû au fait que le muscle utilisé, le *Longissimus thoracis*, est connu comme étant un muscle à faible teneur en collagène (Chriki *et al.*, 2012 ; 2013). Il a été aussi rapporté que les muscles riches en collagène donnent généralement des viandes dures, mais, dans la plupart des études, la relation entre la tendreté de la viande et la teneur en collagène est très faible. La solubilité du collagène, facteur favorable à la tendreté (non corrélée dans cette thèse), dépend de plusieurs caractéristiques biochimiques de la trame conjonctive parmi lesquelles la réticulation des fibres de collagène qui n'ont pas été prises en compte dans cette étude.

Concernant les lipides intramusculaires (LIM), un des résultats les plus remarquables est celui des taurillons où le seul modèle de prédiction obtenu est expliqué exclusivement par les

LIM à hauteur de 9%. Ces résultats sont en accord avec la littérature (pour revue [Hocquette et al., 2010](#) ; [Bauchart et al., 2010](#)). Toutefois, dans les modèles (tout animal confondu) de la tendreté et de l'appréciation globale, ils n'expliquent respectivement que 1,3 et 2,3% de la variabilité. Les études concernant la relation entre la teneur en lipides et la tendreté sont contradictoires. Certains auteurs ne trouvent pas de corrélations ([Renand et al., 2001](#) ; [Jeremiah et al., 2003](#) ; [Chriki et al., 2013](#)), alors que d'autres trouvent des corrélations positives mais faibles ($r = 0,20$ en moyenne) ([Renand et al., 1997](#) ; [Picard et al., 2006](#) ; [Bonny et al., 2015](#)).

Toutefois, même si les taux de prédiction sont faibles à modérés, dans le cadre de cette thèse, connaître les caractéristiques musculaires qui contribuent au déterminisme de la qualité de la viande revêt une importance particulière. Ces résultats sont à considérer dans l'optique de certains objectifs d'élevage et de sélection, et aussi pour comprendre les mécanismes qui se mettent en place durant la transformation du muscle *post-mortem* en viande.

3. Apport des biomarqueurs pour la prédiction et la compréhension des mécanismes impliqués dans la tendreté

La non maîtrise de la tendreté par les caractéristiques musculaires discutée ci-dessus a conduit les chercheurs vers l'utilisation d'outils à haut débit. Les outils de génomique fonctionnelle permettent l'analyse simultanée de centaines ou milliers de gènes ou protéines. Ces approches ont permis l'identification de biomarqueurs potentiels, qui sont à la fois explicatifs et prédictifs ([Bouley et al., 2004](#) ; [Hocquette et al., 2007](#) ; [Bernard et al., 2007](#) ; [Sayd et al., 2006](#) ; [Laville et al., 2009](#) ; [Guillemin et al., 2009](#) ; 2011 ; [Picard et al., 2010](#) ; 2011 ; [Te Pas et al., 2011](#) ; [D'Alessandro et al., 2012](#) ; [Chaze et al., 2013](#) ; [Ouali et al., 2013](#)). Cette alternative s'explique par le fait que les approches traditionnelles (biochimiques ou histochimiques) d'étude des caractéristiques des muscles étaient basées sur un petit nombre de protéines (ou paramètres) et ne prenaient pas en compte la complexité et la multitude des mécanismes biochimiques mis en jeu et leurs interactions. La génomique fonctionnelle semble être une approche intéressante pour étudier sans *a priori* de multiples caractéristiques musculaires, ainsi que leur évolution *post-mortem* au cours de la transformation du muscle en viande. Ces nouvelles stratégies permettent de caractériser plus finement les particularités musculaires en offrant la possibilité d'étudier le protéome musculaire dans son ensemble (modifications *post-mortem* dans le muscle au cours du stockage) ([Bendixen et al., 2003](#) ; [Picard et al., 2010](#)).

Ainsi, les travaux menés depuis plus d'une dizaine d'années maintenant, ont permis d'établir une liste de protéines biomarqueurs (Chapitre IV) de la tendreté de la viande bovine (Hocquette *et al.*, 2007, Chaze *et al.*, 2009 ; Guillemain *et al.*, 2009 ; 2011 ; Picard *et al.*, 2010 ; 2011). Ils ont également conduit au développement d'une technique immunologique de quantification rapide de ces biomarqueurs (Guillemain *et al.*, 2009a,b ; 2011). Leur analyse dans ma thèse a permis d'établir les premières équations d'explication de la tendreté sensorielle et mécanique de la viande.

De ces analyses, il ressort que les taux de prédiction (R^2 -ajustés) de la tendreté sensorielle, la force de cisaillement et d'un indice synthétique regroupant les deux sont variables et diffèrent entre les races et les muscles. Les prédictions toutes races confondues, sont faibles et varient de 10 à 17%. En revanche, les modèles construits race par race expliquent de 21 à 73% (modèle optimal avec 4 variables indépendantes au maximum) de la variabilité de la tendreté des deux muscles étudiés. Ceci m'a conduit à conclure que les mécanismes sont plutôt race spécifique, il est difficile d'appliquer une loi générale pour toutes les races. Ces résultats sont d'une très grande importance (voir ci-dessous), pour comprendre d'un point de vue mécanistique les voies métaboliques qui dictent le développement de la tendreté après la mort de l'animal.

Il est à signaler, par ailleurs, que ces équations sont appliquées à un ensemble d'individus présentant une large gamme de tendreté, alors que les biomarqueurs utilisés ont été initialement identifiés par la comparaison de lots de tendreté extrême (forte *versus* faible). Ceci peut expliquer les difficultés pouvant être rencontrées pour la prédiction d'échantillons de tendreté intermédiaire.

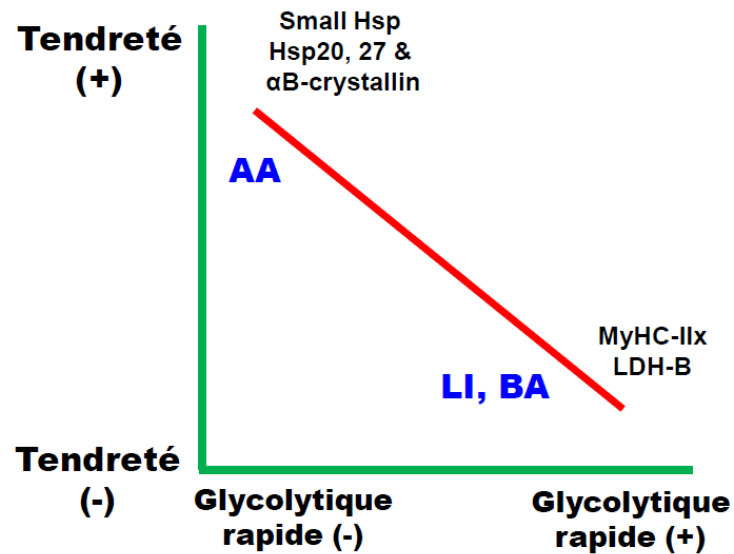
La finalité est de proposer ces modèles par race (ou groupes de races) pour la filière bovine qui est en attente d'un outil permettant de prédire précocement la tendreté de la viande. Cet outil de prédiction en cours de développement dans l'équipe du Dr. B. Picard sera validé et caractérisé pour sa robustesse en utilisant un jeu de données externe. A terme l'utilisation de cet outil pourra permettre de manager la variabilité non maîtrisée de la tendreté.

En outre, les modèles de prédiction construits par muscle et par race révèlent des différences. Généralement, les modèles optimaux du muscle ST sont explicatifs (en terme du % de la variabilité expliquée) que ceux du muscle LT. Par exemple, on explique 53% de la variabilité de la tendreté sensorielle de la race Limousine dans le muscle ST contre 35% dans le muscle LT.

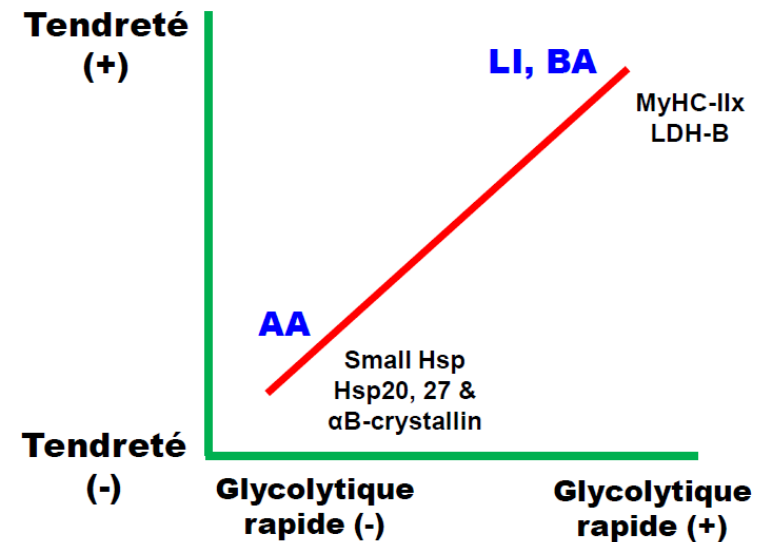
Il en est de même pour l'indice synthétique de tendreté, où 73% vs. 66% de la variabilité est expliquée respectivement pour les muscles ST et LT. De ces résultats, il ressort que les protéines retenues dans les modèles ne sont pas toujours les mêmes entre les deux muscles, et si elles le sont, certaines ne vont pas dans la même direction. Le signe des biomarqueurs (négatif ou positif) dans les équations diffèrent en comparant les modèles entre races, notamment entre l'Aberdeen Angus (race précoce et grasse) et les deux autres races, la Blonde d'Aquitaine et la Limousine (races à maturité tardive et moins grasse). Par exemple, dans le muscle ST, la Prdx6 (une enzyme antioxydante) est positivement corrélée avec la tendreté sensorielle chez la race Aberdeen Angus, mais négativement chez la race Limousine. Une autre protéine, la chaîne légère de myosine de type 1F (MyLC-1F) est négativement corrélée avec la tendreté dans le muscle LT de la race Aberdeen Angus, et positivement en race Limousine. Ces données suggèrent que différents mécanismes gouvernent la tendreté (voir ci-dessous). Certains sont communs aux deux muscles et/ou aux trois races, tandis que d'autres sont muscle et/ou race spécifique. Des recherches supplémentaires s'avèrent nécessaires afin de comprendre plus finement les mécanismes impliqués. C'est pourquoi, l'étude des interactions (interactomique) entre ces protéines étudiées en fonction de la race et du muscle a été entreprise (voir ci-dessous, apport de l'interactomique **Publication n°05**).

Ainsi, les mécanismes impliqués dans la tendreté peuvent être différents selon le muscle ou la race considérés. Néanmoins, sur l'ensemble des indicateurs de la tendreté, la protéine Hsp70-1A/B ressort comme étant un bon biomarqueur de la dureté chez les 3 races et dans les 2 muscles. Hsp70-1A/B trouvée négativement associée avec la tendreté sensorielle et l'indice synthétique et positivement avec la force de cisaillement de Warner-Bratzler, appartient à la famille des larges HSP (sous-groupe 70 kDa). Les membres de cette famille ont été révélés dans de nombreuses études comme associés négativement avec la tendreté (Jia *et al.*, 2009 ; Guillemain *et al.*, 2011 ; Bjarnadottir *et al.*, 2012 ; Baldassini *et al.*, 2015). Ils ont été proposés comme des marqueurs de dureté. Les protéines de stress, sont connues pour jouer un rôle antiapoptotique (Ouali *et al.*, 2006). De ces résultats, j'ai suggéré que la protéine Hsp70-1A/B, contribuerait à la dureté de la viande, du moins chez les trois races étudiées, à travers i) la modulation de l'activité des caspases par une interaction directe et ii) la liaison directe avec ces protéases qui empêcherait ainsi le clivage des substrats et par conséquent leur dégradation.

D'autres protéines telles que la lactate déshydrogénase-B (LDH-B), la chaîne lourde de myosine IIx (MyHC-IIx), les petites protéines de stress (Hsp20, Hsp27 et α B-crystalline) sont liées à la tendreté, mais inversement selon le muscle et la race (Figure 38).



Longissimus thoracis
Muscle rapide oxydo-glycolytique



Semitendinosus
Muscle rapide glycolytique

Figure 38. Schéma illustrant la relation entre les propriétés métaboliques et contractiles du muscle et les petites protéines de stress (small-Hsp) et la tendreté de la viande.

(À gauche) pour le muscle LT, un degré élevé des propriétés glycolytiques rapides est associé avec des notes de tendreté faibles.

(À droite) pour le muscle ST, un degré élevé des propriétés glycolytiques rapides est associé avec des notes de tendreté élevées.

Par conséquent, les biomarqueurs associés aux propriétés contractiles et métaboliques des muscles tels que MyHC-IIx et LDH-B sont positivement ou négativement associés à la tendreté des muscles ST et LT, respectivement. Le contraire a été par ailleurs observé pour d'autres biomarqueurs tels que les petites Hsp (Hsp20, Hsp27 et αB-cristalline). Les muscles ST et LT de la race Aberdeen Angus (AA) ont des niveaux inférieurs de propriétés glycolytiques rapides que ceux des races Limousine (LI) et Blonde d'Aquitaine (BA). Par conséquent, leurs muscles LT et ST sont plus tendres ou durs, respectivement, que ceux des races LI et BA (Picard *et al.*, 2014).

Les protéines MyHC-IIx et LDH-B (isoformes spécifiques du caractère rapide glycolytique) sont associées positivement à la tendreté de la viande dans le muscle ST qui est un muscle de type rapide glycolytique (Figure 38). Au contraire, dans le LT qui est de type plus oxydatif, ces deux protéines sont associées négativement à la tendreté. Les résultats race par race indiquent que les muscles ST et LT de la race Aberdeen Angus (AA) ont des niveaux inférieurs de protéines associées au type glycolytique rapide que ceux des races Limousine (LI) et Blonde d'Aquitaine (BA). Par conséquent, leurs muscles LT et ST sont plus tendres ou durs, respectivement, que ceux des races LI et BA. Ces résultats suggèrent que l'évolution de la tendreté d'une viande serait fonction de certains mécanismes associés aux propriétés contractiles et métaboliques des muscles et d'autres mécanismes qui en seraient indépendants. Par conséquent, ces résultats indiquent que la prédiction de la tendreté doit tenir compte des caractéristiques musculaires et métaboliques et du type d'animal. De plus, ces résultats révèlent qu'un muscle dur pour une race donnée peut ne pas l'être pour une autre.

4. Apport des biomarqueurs pour la prédiction et la compréhension des mécanismes impliqués dans la couleur

La recherche de biomarqueurs de la couleur de la viande bovine n'a débuté que très récemment, en 2012. Ma thèse est la première à élaborer des équations de prédiction de la couleur de la viande bovine à partir de protéines biomarqueurs de la tendreté. Récemment, l'approche protéomique a été proposée pour étudier le protéome du muscle et les changements associés à la stabilité et au développement de la couleur (Hwang *et al.*, 2005 ; Sayd *et al.*, 2006 ; Kwasiborski *et al.*, 2008b ; Joseph *et al.*, 2012 ; Desai *et al.*, 2014 ; Suman *et al.*, 2014 ; Canto *et al.*, 2015 ; Wu *et al.*, 2015 ; Gao *et al.*, 2015). L'ensemble de ces études protéomiques conduites sur la stabilité de la couleur de la viande et les mécanismes impliquant des protéines représentatives de différentes voies métaboliques, ont été réalisées après 24h *post-mortem* ou au-delà. Ma thèse est la première à associer des protéines aux paramètres de la couleur sur des échantillons prélevés la première heure (45 min) après l'abattage. Ceci est original, surtout si nous envisageons de maîtriser les facteurs *post-mortem* affectant la stabilité de la couleur et d'utiliser les protéines impliquées pour la prédiction.

Concernant ce premier critère perçu par le consommateur au moment de l'achat de la viande, les taurillons de la race Blonde d'Aquitaine ont été choisis pour faire l'objet d'une caractérisation afin de comprendre la particularité de la couleur claire de leur viande (**Publication n°04 et Supplément 1 publication n°04**).

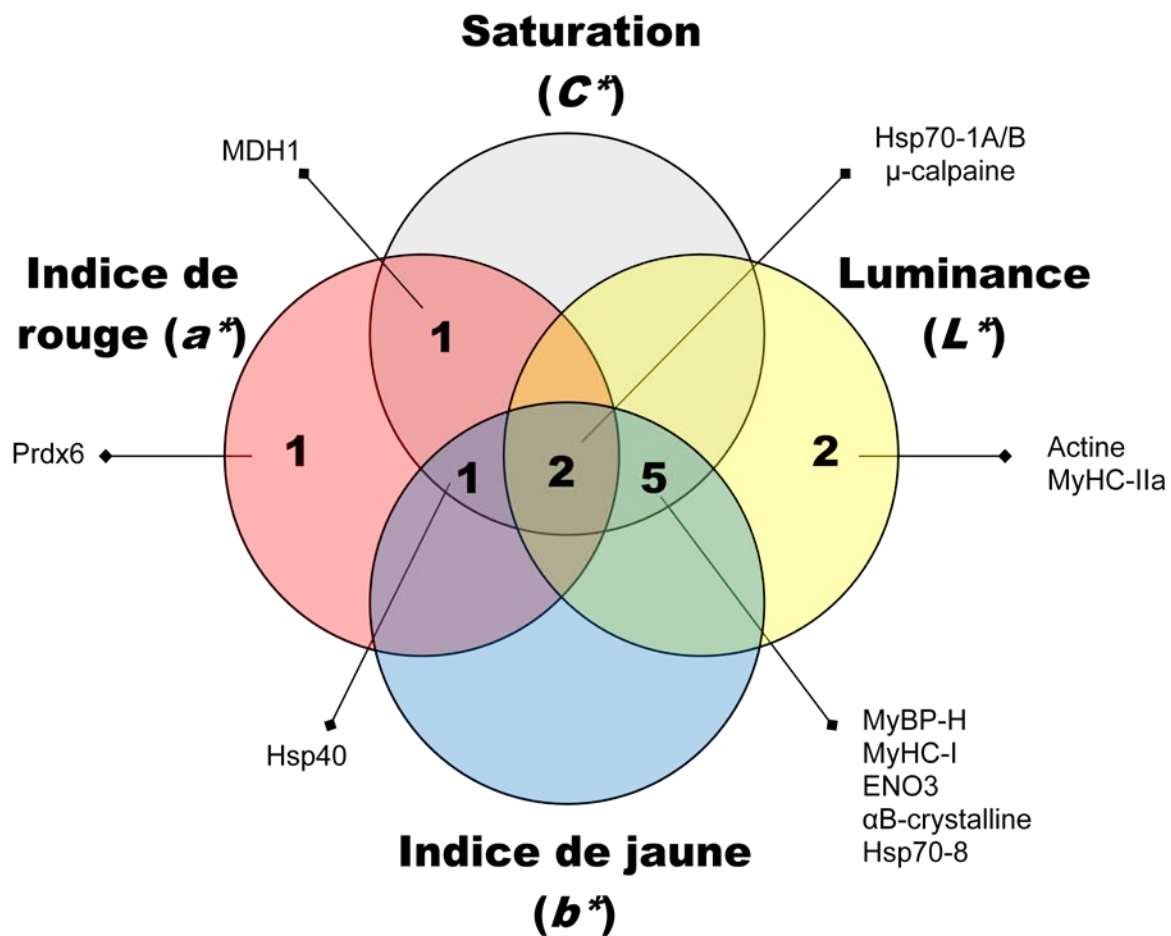


Figure 39. Diagramme de Venn du nombre de biomarqueurs corrélés significativement ($P < 0.05$) avec les paramètres de couleur (L^* , a^* , b^* et C^*) de la viande de la race Blonde d'Aquitaine. La saturation a été calculée à l'aide de la formule suivante : **Saturation (C^*)** = $[(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}]$ et les corrélations obtenues sont données dans le tableau ci-après. L'angle de teinte (h^*) n'a pas été illustré dans le diagramme vu qu'elle n'a été trouvée corrélée significativement qu'avec un seul biomarqueur, Hsp70-Grp75 ($r = -0.49$; $P < 0.05$) et une tendance avec ENO3 ($r = -0.41$; $P = 0.06$).

Coefficients de Pearson des corrélations significatives ($P < 0.05$) de la saturation (C^*) avec les biomarqueurs		
Biomarqueurs	C^*	P -values
μ-calpain	0,69	0,0005
MDH1	0,44	0,0484
ENO3	-0,45	0,0400
MyBP-H	-0,50	0,0210
MyHC-I	0,54	0,0117
αB-cristalline	0,60	0,0043
Hsp40	0,64	0,0018
Hsp70-1A/B	0,70	0,0004
Hsp70-8	0,43	0,0434

Lors de cette expérimentation, de nombreux biomarqueurs de tendreté ont été trouvés corrélés avec les paramètres de couleur de la viande de la Blonde d'Aquitaine : 9 avec la luminance (L^*) et la saturation ou chromaticité (C^*), 8 avec l'indice de jaune (b^*) et 5 avec l'indice de rouge (a^*) (Figure 39).

Les modèles optimaux construits en utilisant entre 2 et 3 variables, expliquent entre 47 et 65% de la variabilité des paramètres de la couleur. À notre connaissance, il n'existe aucune étude récente s'intéressant à la prédiction de la couleur de la viande bovine par des équations intégrant des biomarqueurs issus des analyses protéomiques. Toutefois, quelques études ont tenté de prédire la couleur de la viande du porc. Ainsi, [Kwasiborski et al. \(2008b\)](#) ont rapporté les premières équations de prédiction de la couleur du porc. Les auteurs ont identifié une isoforme de myoglobine et une protéine de choc thermique (Hsp72) qui expliquent à elles seules 84% de la variabilité de la Luminance (L^*). Ils ont également révélé une isoforme de la créatine kinase musculaire (CKM) et une protéine de liaison du calcium qui pourrait expliquer 47 et 69%, respectivement, de la variabilité dans la viande à couleur rouge (a^*) chez les porcs mâles et femelles, respectivement. Suivant la conduite d'élevage, les auteurs rapportent aussi un autre modèle explicatif de L^* chez les porcs conduits à l'intérieur. Le modèle retient une protéine non identifiée reflétant probablement une différence dans les proportions de types de fibres, et l'aminocyclase 1, reflétant le taux du métabolisme *post-mortem* peu après la mort. Les taux de ces 2 protéines expliquent 58% de la variabilité de L^* . Nous constatons suite à nos résultats et ceux de l'étude de [Kwasiborski et al. \(2008b\)](#) que des modèles performants explicatifs de la couleur peuvent être obtenus en utilisant de 2 à 3 biomarqueurs protéiques.

Les résultats de ma thèse, suggèrent que les mécanismes qui régissent la couleur sont proches de ceux de la tendreté, étant donné que la composante musculaire et les facteurs intervenants sont similaires. Parmi les nombreuses corrélations obtenues entre les paramètres de couleur et la liste de biomarqueurs, la plus robuste est celle reliant Hsp70-1A/B (une chaperonne inductible de la famille des larges HSP) et la μ -calpaïne (une enzyme protéolytique Ca^{2+} -dépendante) avec la luminance (L^*), la saturation (C^*) et les indices de rouge (a^*) et jaune (b^*). Ces deux protéines communes à ces 4 paramètres de couleur sont négativement corrélées avec L^* et positivement avec les indices C^* , a^* et b^* (Figure 39). De plus, les deux protéines, Hsp70-1A/B et μ -calpaïne étaient positivement et significativement corrélées ($r = 0.69$, $P < 0.01$).

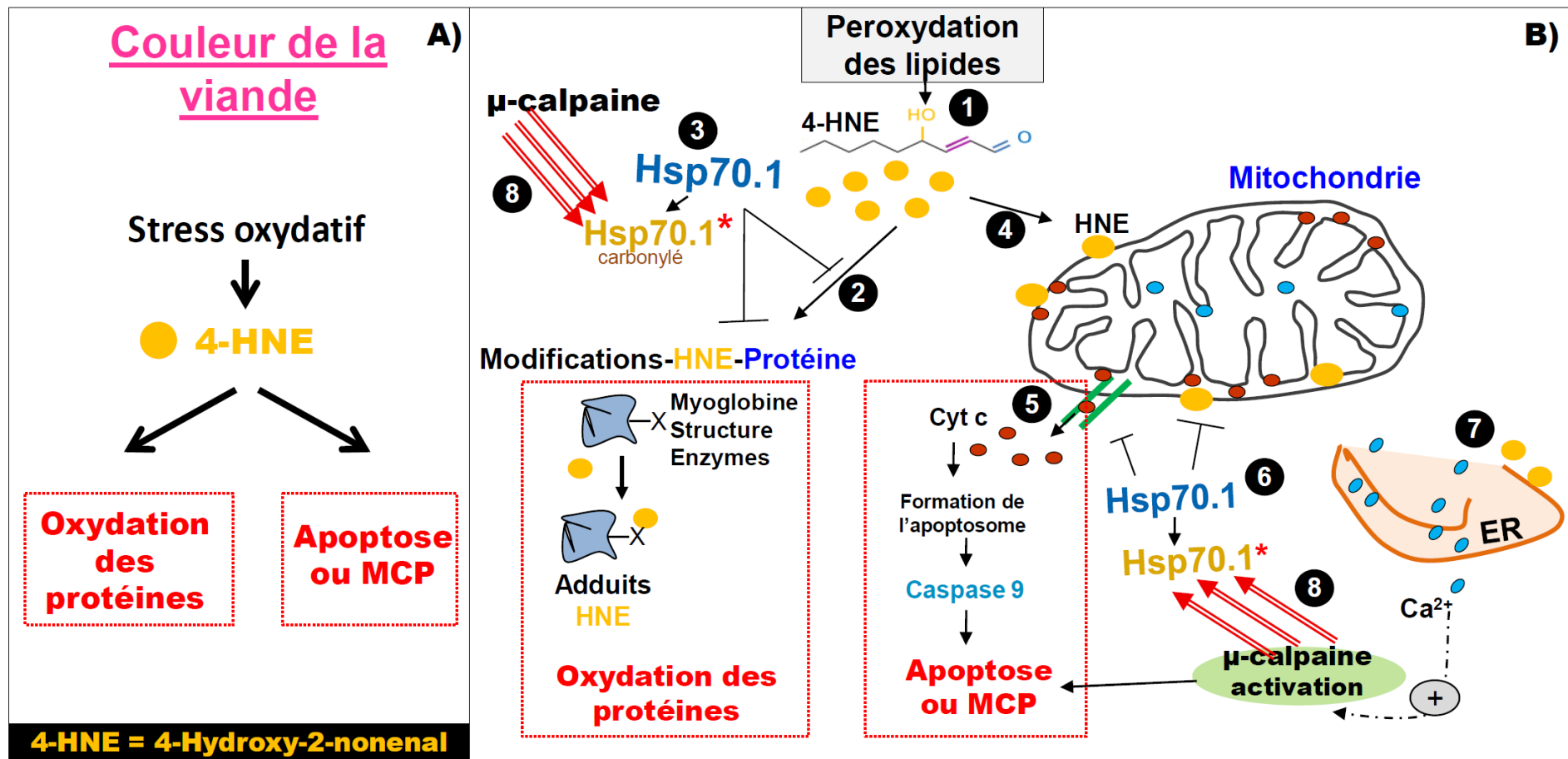


Figure 40. Schéma biologique hypothétique expliquant le rôle de Hsp70-1A/B et la μ -calpaïne dans le développement de la couleur de la viande de la Blonde d'Aquitaine.

A) Après l'abattage, le muscle est sujet au stress oxydatif causant la production de 4-HNE. Cet aldéhyde peut influencer les processus d'oxydation des protéines et d'apoptose.

B) La production de 4-HNE due à (1) la peroxydation des lipides induit (2) la formation d'adduits protéiques via le processus d'oxydation des protéines. De nombreuses protéines musculaires peuvent être des cibles potentielles de ce puissant aldéhyde, par exemple la myoglobine, les protéines de structure et les enzymes glycolytiques. La protéine du stress, Hsp70-1A/B est connue pour (3) son rôle protecteur des protéines musculaires contre la formation d'adduits et, en jouant ce rôle, elle est oxydée (carbonylée). Ceci n'est qu'une partie de ce mécanisme complexe, dans la mesure où (4) le 4-HNE interagit aussi avec les membranes mitochondriales, causant ainsi (5) la sortie (libération) du cytochrome c induisant le phénomène d'apoptose. La protéine du stress, Hsp70-1A/B peut (6) protéger la mitochondrie contre l'attaque de 4-HNE, et par conséquent sera à nouveau oxydée. Enfin, le 4-HNE attaque (7) le réticulum endoplasmique, libérant le Calcium (Ca^{2+}) dans le cytoplasme nécessaire pour l'activité de la μ -calpaïne. La μ -calpaïne activée (8) est connue pour son potentiel protéolytique à cliver la protéine Hsp70-1A/B* oxydée, augmentant ainsi son activité protéolytique. Ceci affectera les protéines de structure et par conséquent leurs propriétés de réfraction de la lumière et de ce fait l'aspect et la couleur de la viande.

A partir de ces résultats, j'ai proposé un mécanisme biologique (Figure 40) pouvant contribuer à expliquer la forte corrélation trouvée entre la μ -calpaïne et la protéine de stress, Hsp70-1A/B. J'ai suggéré que deux phénomènes peuvent contribuer à cette relation et influencer le développement de la couleur : l'oxydation des protéines et le phénomène d'apoptose (Figure 40).

Après l'abattage, le muscle est sujet au stress oxydatif causant la production du 4-hydroxynonéal (4-HNE). Le 4-HNE est un aldéhyde fortement réactif issu de la peroxydation des lipides (Dalleau *et al.*, 2013). La peroxydation lipidique est initiée par l'attaque des radicaux oxygénés libres (ROS, *reactive oxygen species*) sur des acides gras polyinsaturés présents dans la membrane ou le microenvironnement cellulaire et induit la formation des aldéhydes, parmi eux le 4-HNE. La réactivité du 4-HNE est responsable de sa capacité à former des adduits avec tout type de macromolécules : l'ADN (Schaub, 2003), les lipides (Bacot *et al.*, 2003), et surtout les protéines (Bestervelt *et al.*, 1995 ; Dalleau *et al.*, 2013). Cet aldéhyde peut influencer les processus d'oxydation des protéines (formation d'adduits protéiques). De nombreuses protéines musculaires peuvent être des cibles potentielles de ce puissant aldéhyde, par exemple la myoglobine, les protéines de structure et les enzymes glycolytiques (Suman *et al.*, 2006 ; 2007 ; Ramanathan *et al.*, 2012). Il a notamment été rapporté que le potentiel du 4-HNE à se lier au site catalytique de nombreuses enzymes était responsable de l'inhibition de leur activité comme c'est notamment le cas de la Protein Kinase C (Chiarpotto *et al.*, 1999), de la cathepsine B (Crabb *et al.*, 2002), de la sous-unité 20S du protéasome (Ferrington et Kapphahn, 2004), de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (Uchida *et al.*, 1993) ou encore de la lactate déshydrogénase (Ramanathan *et al.*, 2014).

La protéine du stress, Hsp70-1A/B est connue pour son rôle protecteur des protéines musculaires contre la formation d'adduits et, en jouant ce rôle, elle est carbonylée (oxydée) (Carbone *et al.*, 2004). Ceci n'est qu'une partie de ce mécanisme complexe, dans la mesure où le 4-HNE interagit aussi avec les membranes mitochondriales, causant ainsi la libération du cytochrome c induisant le phénomène d'apoptose. En effet, le 4-HNE est capable d'activer la voie JNK (*c-Jun N-terminal kinases*), tant par liaison directe (Parola *et al.*, 1998) qu'en activant sa phosphorylation via des kinases de la voie MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*) sensibles au stress oxydant (Uchida *et al.*, 1999). L'activation de JNK par le 4-HNE permet l'activation de la caspase 3 impliquée dans la mort par apoptose (Cheng *et al.*, 2001).

Du point de vue de la voie mitochondriale, le 4-HNE modifie l'activité d'ATPases, ce qui engendrerait une augmentation cytosolique des taux de Ca^{2+} et générerait le signal apoptotique (Kruman et Mattson, 1999). Ajouté à cela, le 4-HNE peut également être un médiateur de l'apoptose dépendante de la mitochondrie en modifiant l'intégrité de la membrane mitochondriale constituée de cardiolipides. Le cardiolipide (*diphosphatidyl glycerol*) est un lipide qui représente 18 % des molécules de la membrane interne de la mitochondrie et qui est responsable de la forte imperméabilité de la membrane interne aux protons (Wright *et al.*, 2004). L'oxydation du cardiolipide par le cytochrome c, une molécule proapoptotique de l'espace inter-membranaire, peut produire du 4-HNE (Liu *et al.*, 2011) qui va activer à son tour la formation de MOMP (Mitochondrial Outer Membrane Pores) (Kagan *et al.*, 2000) : c'est là l'une des premières étapes de la voie apoptotique intrinsèque.

La protéine du stress, Hsp70-1A/B peut protéger la mitochondrie contre cette attaque du 4-HNE, et par conséquent serait à nouveau carbonylée (Figure 40). Enfin, le 4-HNE attaque le réticulum endoplasmique (RE), libérant le Ca^{2+} dans le cytoplasme nécessaire pour l'activité de la μ -calpaïne. Le 4-HNE est capable de modifier la fonction des canaux impliqués dans l'homéostasie calcique en particulier en se liant aux groupements SH de la pompe SERCA1 (Sarco(endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase 1) du RE (Hortigon-Vinagre *et al.*, 2011; McConnell et Raess, 2002). D'autres voies pourraient être activées, notamment celle des calpaïnes. La μ -calpaïne activée est connue pour son potentiel protéolytique à induire le clivage de la protéine Hsp70-1A/B* carbonylée (substrat type) (Sahara et Yamashima, 2010), augmentant ainsi son activité protéolytique. Ceci affectera, selon mon hypothèse, les protéines de structure et par conséquent leurs propriétés de réfraction de la lumière et de ce fait l'aspect de la viande et sa couleur.

De plus, le phénomène d'apoptose peut être accentué par la formation des adduits. En effet, les adduits HNE-protéines s'accumulent, tout comme les protéines mal repliées, faute de protéines chaperonnes fonctionnelles engagées déjà dans une multitude de voies initiées par les signaux de la mort. Ceci génère une attaque du réticulum endoplasmique (Ron et Walter, 2007) pouvant mener à la mort cellulaire par activation de la caspase 12 ou de la voie JNK initiant la mort des cellules par autophagie (Figure 42). L'autophagie (dont la préposition auto- signifie soi-même et -phagie correspond au verbe manger) est également connue sous l'expression « *auto-cannibalisme cellulaire* ». Ce processus cellulaire, finement régulé, permet à une cellule de survivre lorsqu'elle est privée de nutriments ou soumise à différents stress.

Ce phénomène a été récemment proposé comme étant lié à la mise en place de la qualité de viande, en particulier la tendreté (Sierra et Olivan, 2013 ; Garcia-Macia *et al.*, 2014 ; Hollung *et al.*, 2014). Cependant, le peu de connaissances disponibles sur le muscle *post-mortem* ne permet pas à l'heure actuelle d'associer d'une manière directe ce phénomène à la couleur de la viande. Néanmoins, je suggère qu'au travers de l'implication des ROS, la mort par autophagie aurait un rôle prépondérant dans le déterminisme de la couleur. Il est connu que les ROS interviennent dans la rupture de la membrane externe mitochondriale ou bien dans la formation de canaux affectant les membranes externe et interne (Kroemer *et al.* 2007).

Quant à l'implication des Hsp dans la couleur par les relations de Hsp40 avec C^* , a^* et b^* ou encore de l' α B-crystalline, et de Hsp70-8 avec L^* , C^* et b^* , elle peut être liée à leur rôle protecteur contre la dénaturation des protéines pouvant affecter les propriétés de réfraction et l'aspect de la viande (Sayd *et al.*, 2006 ; Hughes *et al.*, 2014). Ces relations indiquent que les protéines de stress sont exprimées de façon à jouer un rôle important dans le déterminisme de la couleur de la viande. L'importance des protéines HSP dans la conversion du muscle *post-mortem* en viande a été reconnue et associée à l'attendrissage de la viande (Ouali *et al.*, 2006 ; 2013 ; Guillemain *et al.*, 2011 ; Lomiwes *et al.*, 2013 ; 2014a,b). Cependant, les mécanismes biologiques sous-jacents ne sont pas complètement élucidés dans la période *post-mortem*, notamment pour la couleur. Le mécanisme le plus plausible est leur lien avec le phénomène d'apoptose (Takayama *et al.*, 2003 ; Beere, 2004 ; Lanneau *et al.*, 2008). Il est à indiquer que de nombreuses protéines de stress ont été rapportées comme étant liées à la couleur de la viande du porc (Hwang *et al.*, 2005 ; Sayd *et al.*, 2006 ; Kwasiborski *et al.*, 2008b ; Zhang *et al.*, 2014), du mouton (Gao *et al.*, 2015), du bovin (Joseph *et al.*, 2012 ; Suman *et al.*, 2013 ; Wu *et al.*, 2015 ; Canto *et al.*, 2015) et du poisson (Veiseth-Kent *et al.*, 2010 ; Desai *et al.*, 2015). Cette relation peut, à l'heure actuelle, s'expliquer par la protection de la dénaturation des protéines de structure (en particulier les protéines sarcoplasmiques) et l'impact sur les propriétés réfractaires et l'aspect d'un morceau de viande.

5. Apport des biomarqueurs pour la prédiction et la compréhension des mécanismes impliqués dans la chute de pH

L'autre paramètre connu pour affecter la qualité de la viande indépendamment des espèces, est le pH (Purchas et Aungsupakorn, 1993). Dans cette thèse, le pH mesuré en cinétique à 45min, 3h et 30h après abattage a pu être corrélé pour la première fois chez le bovin avec de nombreux biomarqueurs (**Publication n°04**).

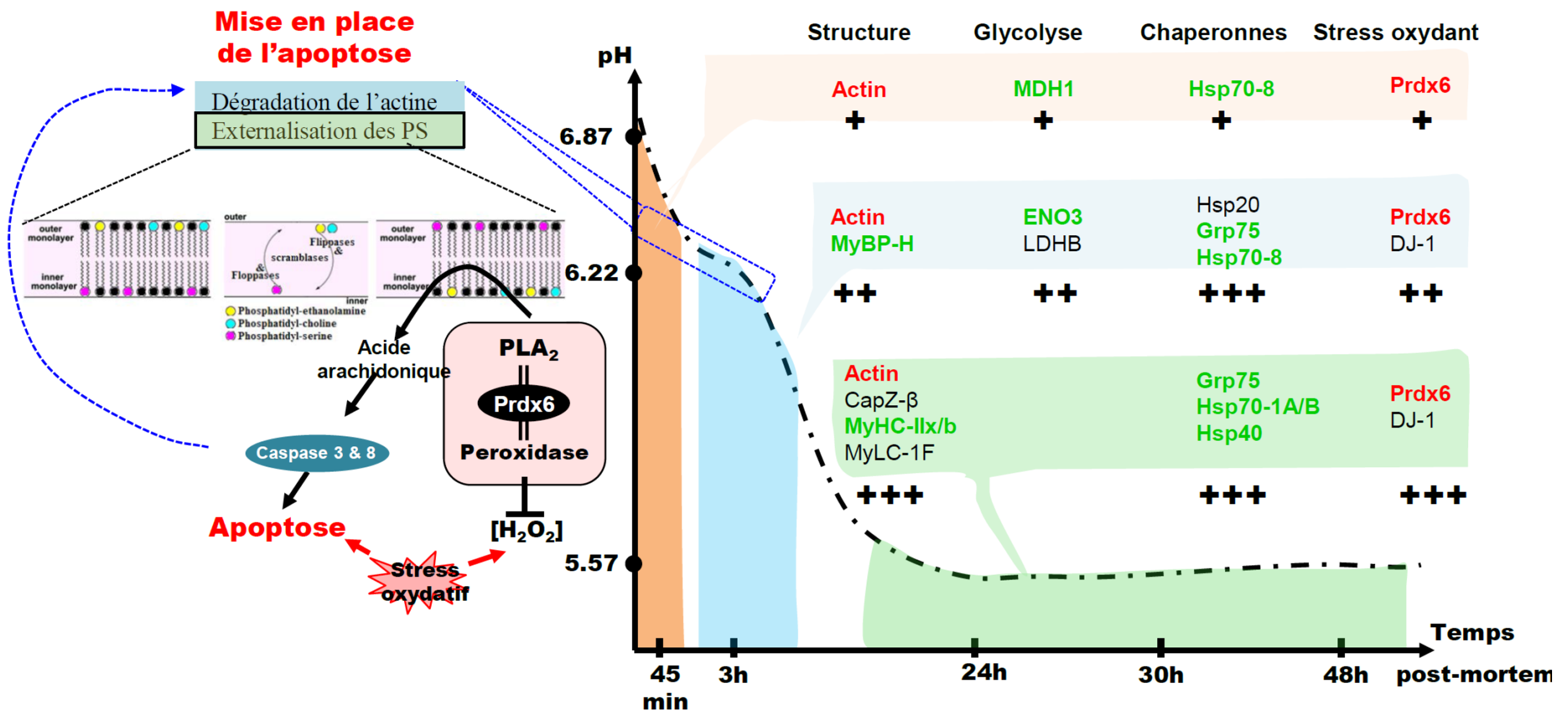


Figure 41. Relation entre les biomarqueurs et la chute de pH. Le rôle des indicateurs de l'apoptose (actine et externalisation des phosphatidylsérines) dans l'évolution de pH est illustré.

Les paramètres $\text{pH}_{45\text{min}}$, $\text{pH}_{3\text{h}}$ et pH_u ont été corrélés avec 3, 7 et 6 protéines, respectivement. La peroxyrédoxine 6 (Prdx6) a été trouvée associée aux trois paramètres de pH mesurés. Par ailleurs, des modèles retenant 3 à 4 variables ont été construits et expliquent 47, 59 et 58% de la variabilité de $\text{pH}_{45\text{min}}$, $\text{pH}_{3\text{h}}$ et pH_u , respectivement. Comme pour la couleur, ma thèse est la première à établir des modèles de prédiction du pH de la viande bovine. Seuls, les récents résultats de [Terlouw et al. \(2015\)](#) sur le porc rapportent un modèle expliquant 84,6% de la variabilité du pH_u du muscle *Longissimus lumborum*. Les protéines retenues dans leur modèle, ont des fonctions communes que les nôtres avec un impact prononcé de Hsp70. De ce fait, les mécanismes impliquées peuvent être similaires entre espèces.

La performance de ces modèles explicatifs du pH réside dans la compréhension des mécanismes *pré-* et *post-mortem* gouvernant les critères de la qualité sensorielle. Par exemple, une meilleure compréhension des effets du stress à l'abattage sur la réponse physiologique et biochimique des tissus bovins permettra une meilleure connaissance de l'évolution du pH et l'impact sur les critères de qualité, notamment la couleur et la tendreté.

A ma connaissance, cette thèse est la première à révéler quelques mécanismes impliquant le pH en utilisant la liste des 21 biomarqueurs de tendreté (Figure 41). L'analyse des corrélations montre que la protéine Prdx6 est la seule dont l'abondance explique significativement les trois paramètres de pH ($\text{pH}_{45\text{min}}$, $\text{pH}_{3\text{h}}$ et pH_u) du muscle LT de la race Blonde d'Aquitaine. Un mécanisme impliquant cette protéine sera discuté dans ce qui suit et d'autres (Hsp70-Grp75, DJ-1 et enzymes de la glycolyse : ENO3 et LDH-B) seront abordées dans la partie interactomique (voir ci-dessous).

Des relations protéines-chute de pH, ont été révélées par cette partie de ma thèse. Les protéines concernées sont plus ou moins impliquées dans le phénomène de la mort des cellules par apoptose. On peut donc supposer que l'apoptose et toutes ces conséquences soient mises en place dès la première heure suivant l'abattage. Au moment où la glycolyse progresse dans le muscle *post-mortem*, il faut aussi s'attendre à un taux constant de chute de pH et d'accumulation de lactate au cours du stockage de la viande. Or, la cinétique de chute de pH *post-mortem* n'est pas continue comme rapporté par plusieurs travaux de notre groupe ([Ouali et al., 2006 ; 2007 ; Boudjellal et al., 2008 ; Becila et al., 2010](#)). Il a été suggéré que cette discontinuité pourrait être le résultat du remplacement des groupements acides (phosphatidylserine (PS)) par les groupements basiques (phosphatidylcholine (PC) et phosph-

atidylethanolamine (PE)) dans le compartiment intracellulaire. Ce phénomène serait accompagné d'une redistribution des ions, permettant d'expliquer l'existence de courts paliers, dans la cinétique de chute de pH. Ce mécanisme, connu sous le nom de l'externalisation des phosphatidylsérines, est considéré comme un des marqueurs du phénomène d'apoptose (Martin *et al.*, 1995).

Les nouvelles connaissances apportées dans cette thèse me permettent de proposer une nouvelle hypothèse justifiant le rôle de la Prdx6 dans la transformation *post-mortem* du muscle en viande et dans la discontinuité de la cinétique de chute de pH grâce à la corrélation robuste obtenue. Plusieurs auteurs ont suggéré que la Prdx6 grâce à sa double fonction, enzyme antioxydante et phospholipasique de son groupe PLA2 (Phospholipase A2) (Manevich *et al.*, 2009 ; Fisher, 2011) interviendrait dans le mécanisme d'externalisation des PS. Les phospholipases A2 (PLA2) sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse de phospholipides afin de libérer un acide gras et un lysophospholipide (Alonso *et al.*, 1986 ; Penzo *et al.*, 2004). La PLA2, notamment cPLA2 α (possédant un domaine de liaison au Ca²⁺) est activée en réponse à une augmentation de la concentration calcique intracellulaire (Burke *et Dennis*, 2009). La liaison de deux ions Ca²⁺ au domaine C2 induit la translocation de la phospholipase du cytosol vers les membranes nucléaires et du réticulum endoplasmique. Elle se lie de manière préférentielle à la PC présente en abondance au niveau de ces membranes au moment du déclenchement de l'apoptose (Evans *et al.*, 2001). La liaison du Ca²⁺ au domaine C2 induit l'association des résidus hydrophobes avec la PC membranaire permettant ainsi la pénétration de la PLA2 dans la bicouche lipidique. Grâce à l'activité de PLA2 de la Prdx6, la PC sera hydrolysée (Penzo *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2014). Ainsi, son pouvoir tampon sera réduit permettant la continuité de la chute de pH dans le cytosol. Le tamponnage momentané aura donc un effet sur la consommation des protons générés par la glycolyse.

Mes résultats permettent d'approfondir les connaissances concernant les événements biochimiques qui surviennent juste après la mort de l'animal. Ainsi, des hypothèses ont pu être proposées pour expliquer l'origine des qualités particulières de la viande de la race Blonde d'Aquitaine. Ces hypothèses demandent à être vérifiées sur d'autres races très différentes, comme l'Aberdeen Angus. Ces résultats permettent également de proposer de nouvelles pistes d'investigation pour une compréhension des mécanismes et une meilleure maîtrise de la variabilité des qualités de viande.

6. Apport de l'interactomique pour la compréhension des mécanismes biologiques gouvernant la transformation post-mortem du muscle en viande

L'ensemble des résultats et mécanismes discutés précédemment démontre que l'étude du protéome permettrait d'élucider au mieux le déterminisme des qualités des viandes en identifiant des liens robustes associés aux phénotypes recherchés afin de pouvoir les discriminer. L'interactomique, étude des interactions entre les différentes molécules biochimiques (Collura et Boissy, 2007), a été ainsi récemment proposée dans le muscle *post-mortem* pour identifier les voies métaboliques impliquées dans le déterminisme de la qualité (Guillemin et al., 2011 ; Carrera et al., 2013). Globalement, les outils d'interactomique (une branche de la bioinformatique) génèrent par une analyse *in silico* des relations entre les protéines en se basant sur la bioinformation obtenue par expérimentation et stockée dans les entrepôts de banques de données. Cependant, l'ensemble de ces données sont souvent issues des domaines de la biologie moléculaire manipulant des animaux modèles et ne reflètent pas toujours les relations pouvant exister (bien qu'elles puissent être extrapolées entre espèces). Partant de ce constat, j'ai proposé d'opter pour des réseaux de corrélations statistiques (*correlation networks*) afin d'étudier les liens entre chacun des biomarqueurs en m'inspirant de ce qui a été rapporté dans la littérature (Friedman et Alm, 2012 ; Cooper et al., 2015).

En utilisant les abondances des biomarqueurs des 3 races continentales (Aberdeen Angus, Blonde d'Aquitaine et Limousine) et deux muscles (LT et ST), j'ai élaboré les premiers réseaux de corrélations des biomarqueurs de la viande bovine (**Publication n°05**). Les interactomes ont été obtenus en utilisant les coefficients de corrélation significatifs ($P < 0,05$) de Pearson. Ils m'ont permis d'identifier les voies métaboliques susceptibles d'être liées de manière robuste à la qualité de la viande, et de révéler les mécanismes biochimiques sous-jacents aux deux muscles et trois races. Par cette démarche, j'ai révélé que certaines protéines jouent des rôles centraux indépendamment du muscle et la race et sont associées à des voies métaboliques clés dans la phase *post-mortem* (Ouali et al., 2013).

Par exemple, la protéine DJ-1 a été identifiée comme étant située à un carrefour entre les protéines du métabolisme glycolytique et les petites protéines de stress. DJ-1 a été initialement répertoriée comme un oncogène (Nagakubo et al., 1997) et plus tard s'est révélée être une protéine de peroxyde sensible à l'hydrogène, ce qui suggère qu'elle peut fonctionner comme un antioxydant (Mitsumoto et al., 2001). Cette protéine multifonctionnelle participe à la régulation de la transcription, aux réactions de stress oxydant, a un rôle chaperonne, une

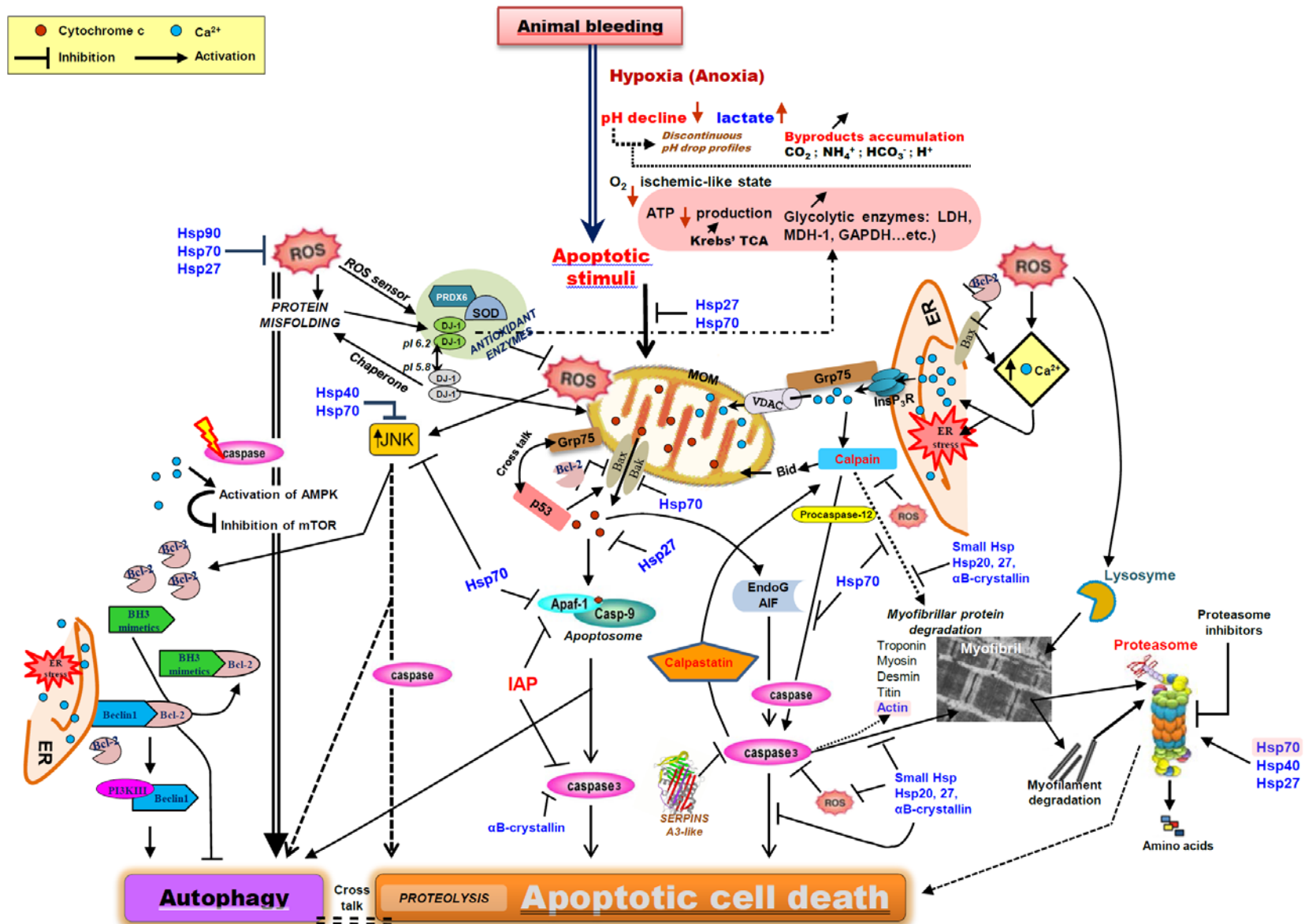


Figure 42. Schéma mécanistique intégratif de la majorité des biomarqueurs étudiés pour décrire les mécanismes susceptibles de gouverner les étapes de la transformation du muscle *post-mortem* en viande en relation avec le phénomène d'apoptose. J'ai construit ce schéma afin de synthétiser l'ensemble des connaissances acquises lors de cette thèse d'une part, et en m'appuyant sur les données bibliographiques sur le phénomène d'apoptose rapportées depuis la première hypothèse de ce mécanisme dans le muscle juste après la mort de l'animal, d'autre part.

activité protéolytique et régulatrice au niveau mitochondrial (Baltazar *et al.*, 2015). Un de ses rôles important, est qu'elle est capable de jouer un rôle « scavenger » des ROS via un mécanisme d'auto-oxydation de son résidu cystéine, conduisant à la formation d'une DJ-1 oxydée (Figure 42). A la lumière de ces résultats, il ressort que les stress cellulaire et oxydant avec toutes leurs conséquences, vont jouer un rôle majeur dans le développement des qualités des viandes. De plus, il peut être suggéré que la protéine DJ-1 jouera un rôle protecteur de la mitochondrie contre les ROS et permettra d'éviter la voie de la mort par autophagie.

Par ailleurs, mes résultats ont révélé une relation forte entre la μ -calpaïne et la Prdx6, indépendamment du muscle et de la race. Les rôles de ses deux protéines ont été largement discutés précédemment, notamment celui impliquant la Prdx6 dans l'inversion de la membrane, par l'hydrolyse de la phosphatidylcholine par son groupe PLA2. La relation entre ces deux protéines peut être expliquée par le rôle régulateur de la protéolyse (μ -calpaïne) sur l'activité de la Prdx6 en présence de peroxyde (Wood *et al.*, 2003).

Les interactomes confirment aussi, que des spécificités par muscle et race existent. Les résultats obtenus renforcent les conclusions proposées précédemment, montrant que les mécanismes d'établissement des qualités de viande sont d'une part, race et muscle spécifiques et d'autre part, propriétés métaboliques et contractiles dépendants. Dans le muscle LT, les enzymes de la glycolyse sont au cœur de nombreux nœuds. Alors que dans le muscle ST ce sont les petites protéines de stress (small-HSP).

Indépendamment de la race et particulièrement pour le muscle LT, la protéine Hsp70-Grp75 a été trouvée en plus d'être liée à la couleur et au pH, corrélée à de nombreuses protéines. Elle est corrélée avec le métabolisme glycolytique (LDH-B et MDH1), la protéolyse (μ -calpaïne), la structure (MyLC-1F) et le stress oxydant (DJ-1 et Prdx6). Hsp70-Grp75, la seule chaperonne mitochondriale connue, est présente dans presque tous les compartiments cellulaires et est induite par la privation de glucose, par le Ca^{2+} , ou par des agents perturbateurs de la glycolyse (Wiedemann *et al.*, 2004). Ma thèse est la première à révéler des relations directes entre cette protéine multifonctionnelle et d'autres protéines ou critères de la qualité de la viande bovine. De plus, Hsp70-Grp75 est impliquée dans le transport et le pliage des protéines mitochondriales et la protection des cellules contre le manque de glucose et l'accumulation des ROS (Mayer, 2013). Son rôle protecteur peut expliquer par exemple la relation trouvée entre son abondance à 45 min *post-mortem* et la chute rapide du pH impliquant les enzymes de la glycolyse. La Hsp70-Grp75 peut séquestrer

et inactiver la p53, une protéine facteur de transcription impliquée dans l'apoptose, régulant ainsi sa translocation nucléaire et la mise en place de l'apoptose (Kaul *et al.*, 2007). Cette hypothèse est renforcée par le rôle qu'elle joue dans le transit du Ca^{2+} . Elle relie le récepteur de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3R) du réticulum endoplasmique (RE) vers les canaux anioniques voltage-dépendants de la mitochondrie (VDAC) (Figure 42), augmentant probablement le flux de Ca^{2+} du RE vers la mitochondrie (Malli et Graier, 2010 ; Ouali *et al.*, 2013). Ce mécanisme peut également contribuer à la relation entre Hsp70-Grp75 et la chute de pH. Ceci est plausible, étant donné que le Ca^{2+} exerce des effets régulateurs sur de nombreuses enzymes et les protéines impliquées dans les processus métaboliques et apoptotiques, y compris ceux du muscle *post-mortem*. L'ensemble de ces résultats constituent des arguments forts pour impliquer Hsp70-Grp75 dans les mécanismes de l'attendrissage.

Afin de synthétiser, les apports de cette thèse sur l'ensemble des mécanismes susceptibles d'intervenir dans la mise en place des qualités des viandes en relation avec : la glycolyse, le phénomène d'apoptose, la mitochondrie, le réticulum endoplasmique, le stress oxydant et l'autophagie, un schéma biologique impliquant la majorité des protéines marqueurs utilisées est proposé (Figure 42). Ce schéma général ouvre de nouvelles pistes de recherches pour une meilleure compréhension des mécanismes et la validation de nouveaux marqueurs clés des voies susceptibles d'élucider le phénomène d'attendrissage *post-mortem* des viandes.

Les connaissances actuelles concernant l'apoptose et l'autophagie dans le muscle ne permettent cependant pas de déterminer avec précision le rôle de chacun dans le processus d'attendrissage. D'autres investigations s'avèrent nécessaires pour élucider les mécanismes et comprendre les phénomènes impliqués et leur impact sur la qualité.

7. La bov-SERPINA3 – vers la validation et l'intégration à la liste des biomarqueurs

Les travaux de Ouali et Talmant, (1990) et Zamora *et al.* (1996) ont montré que le taux des inhibiteurs dans le tissu musculaire était le meilleur indice de prédiction de la tendreté de la viande. Quelques années après, plusieurs recherches ont été conduites et ont abouti à la caractérisation de ces inhibiteurs dans le muscle (Tassy *et al.*, 2005 ; Herrera-Mendez *et al.*, 2006b). La grande majorité des inhibiteurs révélés étaient des inhibiteurs de serine peptidases parmi lesquels de nombreuses serpinines (Herrera-Mendez *et al.*, 2009 ; Péré-Brissaud *et al.*, 2015). Cependant, les travaux menés n'ont pas révélé de relation directe (corrélations ou régression) entre les serpinines et la tendreté (sensorielle ou mécanique) de la viande bovine, et par conséquent n'ont pas fait l'objet d'une valorisation pour la prédiction de la tendreté

de la viande. Lors de ma thèse, j'ai souhaité réaliser un état de l'art (**Publication n°06**) sur les fonctions biologiques de ces inhibiteurs et leurs rôles potentiels dans la tendreté de la viande avant d'effectuer des analyses complémentaires ayant pour objectif leur validation et intégration dans la liste des biomarqueurs. Les informations extraites de ma synthèse bibliographique ont démontré qu'il s'avérait intéressant d'effectuer une démarche protéomique ciblée sur l'analyse de cette famille afin d'identifier les membres à intégrer dans la liste de biomarqueurs des qualités sensorielles. Une démarche particulière a ainsi été proposée dans ma thèse, en focalisant sur le polymorphisme protéique de la bov-SERPINA3. Pour cela, des échantillons de muscles de vaches de la race Maine-Anjou, reflétant des lots de tendreté extrêmes (haute *versus* faible) ont été analysés. Faute de temps, les analyses sont actuellement en cours de réalisation. Mes résultats préliminaires s'avèrent très satisfaisants, ils révèlent que sur ces lots de tendreté une relation étroite existe et indique une surabondance de la bov-SERPINA3 dans le lot de viande dure. L'abondance de la bov-SERPINA3 peut donc être utilisée pour discriminer les animaux à viande dure. L'analyse des corrélations a révélé une relation positive avec la force de cisaillement et une relation négative avec les notes de tendreté sensorielle. Des analyses supplémentaires de 2-DE et l'optimisation de la quantification de la bov-SERPINA3 par Dot-Blot sont en cours (**Papier n°07** en préparation).

8. Limites de la thèse

Une des limites de cette thèse est qu'elle ne s'intéresse pas aux différentes isoformes de protéines. En effet, certains résultats ont montré que des isoformes de protéines telles que Hsp27 ou les troponines T rapides ([Chaze et al., 2013](#)) étaient reliées différemment à la tendreté. Or, la technique de Dot-Blot utilisée pour la quantification de l'abondance relative des protéines s'appuie sur l'utilisation d'anticorps reconnaissant l'ensemble des isoformes. Ainsi, certaines isoformes de protéines codées par des gènes différents, ou issues de phénomènes d'épissage alternatif, ou encore ayant subi des modifications post-traductionnelles (MPT) telles que des phosphorylations, n'ont pas été étudiées et pourraient cependant correspondre à de bons biomarqueurs. Afin de remédier à ce problème, des recherches supplémentaires doivent être menées afin de proposer des solutions. La stratégie pourrait être soit une production et utilisation d'anticorps spécifiques pour chaque isoforme, soit de songer à l'utilisation de la phosphoprotéomique ([Huang et al., 2011 ; 2012 ; 2014](#)) afin de pouvoir révéler ou non des différences dans les relations entre les isoformes de la protéine et les critères de qualité de viande. Ces analyses pourraient nous permettre de conclure ainsi sur l'impact du polymorphisme protéique sur le critère de qualité étudié.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

L'objectif de mon travail de thèse était de comprendre les mécanismes impliqués dans l'élaboration des qualités sensorielles et des paramètres technologiques de la viande bovine et surtout d'améliorer le pouvoir prédictif des modèles d'explication de leur variabilité. Par une approche mécanistique, j'ai apporté de nouvelles connaissances sur les mécanismes gouvernant le déterminisme de différents critères de la qualité de la viande bovine : la tendreté, la couleur et le pH. Mes résultats montrent que l'analyse sensorielle de la viande est d'une importance capitale pour cerner les préférences des consommateurs qui dépendent de leurs habitudes alimentaires.

Des modèles de prédiction (voir aussi d'explication) de la tendreté, de l'appréciation globale et pour la première fois de la couleur et du pH de la viande ont été obtenus. Les modèles reflètent un ensemble de mécanismes régissant la transformation *post-mortem* du muscle en viande et ouvrent de nouvelles voies de recherches. En outre, les modèles obtenus sont différents entre races et muscles, et certains sont dépendants des caractéristiques contractiles et métaboliques des muscles considérés.

Mes résultats montrent la complexité des interactions qui existent entre les biomarqueurs étudiés, leur abondance et les critères de qualité de la viande bovine. Les nouveaux mécanismes révélés grâce à « l'interactomique » en utilisant les corrélations robustes, contribueront à une meilleure compréhension des causes de la variabilité dans les différentes qualités de la viande bovine. Mes résultats plaident pour un rôle majeur de la mitochondrie et des phénomènes associés, à savoir l'apoptose, le stress oxydant et probablement l'autophagie dans le déterminisme des critères de la qualité de la viande. Des mécanismes biologiques pertinents ont été aussi proposés pour expliquer la variabilité ou les nouvelles relations obtenues, et ceci en se basant sur les connaissances acquises via la stratégie mécanistique entreprise au travers de ma thèse.

Enfin, pour finaliser l'ensemble de ce travail de thèse, il sera nécessaire de valider la démarche entreprise, à savoir l'application des équations de prédiction obtenues sur de nouvelles données provenant des mêmes types d'animaux ou d'autres races, et ceci à partir de nouveaux échantillons provenant d'autres expérimentations. La même liste de protéines peut être aussi proposée pour expliquer et/ou prédire simultanément d'autres critères de qualité comme la capacité de rétention d'eau de la viande.

Comme perspectives, il est souhaitable de prendre en compte les mécanismes mis en évidence par les résultats de ma thèse et d'entreprendre des recherches ciblées notamment sur les rôles que peuvent jouer la mitochondrie et le réticulum endoplasmique (RE) ou leur interaction dans le phénomène d'attendrissage. Certaines protéines peuvent être intéressantes à regarder de près comme la Hsp70-Grp75, liant la mitochondrie au réticulum endoplasmique ou la DJ-1, une enzyme aux multiples facettes, dont les fonctions ne sont pas encore identifiées dans le muscle bovin. Il serait aussi intéressant d'approfondir le rôle du 4-hydroxynonéal en relation avec l'oxydation des protéines et son impact sur les qualités de la viande, notamment la couleur.

Le calcium, est également une piste intéressante à explorer pour mieux cerner les phénomènes biologiques impliqués, notamment ceux liés à la production d'énergie pendant la période *post-mortem*. Les nombreuses voies métaboliques identifiées comme pouvant être impliquées dans le phénomène d'attendrissage sont ATP-dépendantes, en particulier le processus de mort cellulaire par apoptose. Cela souligne la question de l'origine de l'énergie lorsque les réserves énergétiques sont épuisées ? Il serait donc intéressant d'approfondir ce volet avec des méthodes adaptées, en commençant par l'exploration du rôle du métabolisme des fibres musculaires et celui des lipides (β -oxydation par exemple) dans la production d'énergie.

Par ailleurs, il serait souhaitable de prendre en compte les pratiques d'élevage dans la construction des modèles mais également d'augmenter les effectifs d'animaux pour augmenter leur robustesse. En parallèle, il serait intéressant de mieux évaluer l'impact du niveau de stress des animaux à l'abattage et des processus oxydatifs liés à l'expression de certains biomarqueurs et leur relation avec les différentes qualités de la viande.

Une des limites de ce travail, était la quantification de l'abondance totale des protéines, or, certaines protéines possèdent une à plusieurs isoformes, pour remédier à cela il faudrait mettre en place une stratégie d'identification ciblée des biomarqueurs présentant un polymorphisme protéique.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Aaslyng M., Kerry J. & Ledward D. (2002) Quality indicators for raw meat. *Meat processing: improving quality*, 157-74.
- Abril M., Campo M.M., Önenç A., Sañudo C., Albertí P. & Negueruela A.I. (2001) Beef colour evolution as a function of ultimate pH. *Meat Science* **58**, 69-78.
- Adams V., Gielen S., Hambrecht R. & Schuler G. (2001) Apoptosis in skeletal muscle. *Front Biosci* **6**, D1-D11.
- Adrain C. & Martin S.J. (2001) The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci* **26**, 390-7.
- Aebersold R. & Mann M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**, 198-207.
- Ahmed Z., Donkor O., Street W.A. & Vasiljevic T. (2015) Calpains- and cathepsins-induced myofibrillar changes in post-mortem fish: Impact on structural softening and release of bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology* **45**, 130-46.
- Akaaboune M., Hantai D., Smirnova I., Lachkar S., Kapsimali M., Verdiere-Sahuque M. & Festoff B.W. (1998) Developmental regulation of the serpin, protease nexin I, localization during activity-dependent polyneuronal synapse elimination in mouse skeletal muscle. *J Comp Neurol* **397**, 572-9.
- Allais S., Leveziel H., Hocquette J.F., Rousset S., Denoyelle C., Journaux L. & Renand G. (2014) Fine mapping of quantitative trait loci underlying sensory meat quality traits in three French beef cattle breeds. *J Anim Sci* **92**, 4329-41.
- Allingham P.G., Harper G.S. & Hunter R.A. (1998) Effect of growth path on the tenderness of the semitendinosus muscle of Brahman-cross steers. *Meat Science* **48**, 65-73.
- Almeida A.M., Bassols A., Bendixen E., Bhide M., Ceciliani F., Cristobal S., Eckersall P.D., Hollung K., Lisacek F., Mazzucchelli G., McLaughlin M., Miller I., Nally J.E., Plowman J., Renaut J., Rodrigues P., Roncada P., Staric J. & Turk R. (2015) Animal board invited review: advances in proteomics for animal and food sciences. *Animal* **9**, 1-17.
- Almeida A.M., Plowman J.E., Harland D.P., Thomas A., Kilminster T., Scanlon T., Milton J., Greeff J., Oldham C. & Clerens S. (2014) Influence of feed restriction on the wool proteome: a combined iTRAQ and fiber structural study. *J Proteomics* **103**, 170-7.
- Alnemri E.S., Livingston D.J., Nicholson D.W., Salvesen G., Thornberry N.A., Wong W.W. & Yuan J. (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* **87**, 171.
- Alonso F., Henson P.M. & Leslie C.C. (1986) A cytosolic phospholipase in human neutrophils that hydrolyzes arachidonoyl-containing phosphatidylcholine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **878**, 273-80.
- Andersen H.J., Oksbjerg N., Young J.F. & Therkildsen M. (2005) Feeding and meat quality – a future approach. *Meat Science* **70**, 543-54.
- Anderson N.L. & Anderson N.G. (1998) Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* **19**, 1853-61.
- Ansary M., Laurent E. & Roupain J. (1974) Individualité musculaire chez le bovin : étude de l'équipement enzymatique de quelques muscles. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* **14**, 471-86.

- Anton Leberre V. (2013) Biopuces : applications et devenir. *Techniques de l'ingénieur Nanotechnologies et biotechnologies pour la santé* **base documentaire : TIB608DUO**.
- Arrigo A.P. (2005) Heat shock proteins as molecular chaperones. *M S-Medecine Sciences* **21**, 619-25.
- Arrigo A.P., Paul C., Ducasse C., Manero F., Kretz-Remy C., Viot S., Javouhey E., Mounier N. & Diaz-Latoud C. (2002) Small Stress Proteins: Novel Negative Modulators of Apoptosis Induced Independently of Reactive Oxygen Species. In: *Small Stress Proteins* (eds. by Arrigo A-P & Müller WEG), pp. 185-204. Springer Berlin Heidelberg.
- Ashkenazi A. (2002) Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* **2**, 420-30.
- Astruc T. (2014a) CONNECTIVE TISSUE: STRUCTURE, FUNCTION, AND INFLUENCE ON MEAT QUALITY. In: *Encyclopedia of Meat Sciences (Second Edition)* (eds. by Dikeman M & Devine C), pp. 321-8. Academic Press, Oxford.
- Astruc T. (2014b) MUSCLE FIBER TYPES AND MEAT QUALITY. In: *Encyclopedia of Meat Sciences (Second Edition)* (eds. by Dikeman M & Devine C), pp. 442-8. Academic Press, Oxford.
- Asumendi A., Andollo N., Boyano M.D., Hilario E., Perez-Yarza G., Atencia R., Arechaga J. & Garcia-Sanz M. (2000) The role of cleavage of cell structures during apoptosis. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **46**, 1-11.
- Atencia R., Asumendi A. & García-Sanz M. (2000) Role of cytoskeleton in apoptosis. In: *Vitamins & Hormones* (pp. 267-97. Academic Press.
- Augusteyn R.C. (2004) alpha-crystallin: a review of its structure and function. *Clin Exp Optom* **87**, 356-66.
- Aussel C., Pelassy C. & Breitmayer J.P. (1998) CD95 (Fas/APO-1) induces an increased phosphatidylserine synthesis that precedes its externalization during programmed cell death. *FEBS Lett* **431**, 195-9.
- Bacot S., Bernoud-Hubac N., Baddas N., Chantegrel B., Deshayes C., Doutheau A., Lagarde M. & Guichardant M. (2003) Covalent binding of hydroxy-alkenals 4-HDDE, 4-HHE, and 4-HNE to ethanolamine phospholipid subclasses. *Journal of Lipid Research* **44**, 917-26.
- Bailey A.J. & Light N.D. (1989) *Connective tissue in meat and meat products*. Elsevier Applied Science.
- Baldassini W.A., Braga C.P., Chardulo L.A.L., Silva J.A.I.I.V., Malheiros J.M., de Albuquerque L.G., Fernandes T.T. & Padilha P.d.M. (2015) Bioanalytical methods for the metalloproteomics study of bovine longissimus thoracis muscle tissue with different grades of meat tenderness in the Nellore breed (*Bos indicus*). *Food Chemistry* **169**, 65-72.
- Baltazar M.T., Dinis-Oliveira R.J., Bastos M.d.L. & Carvalho F. (2015) Paraquat: Molecular Mechanisms of Neurotoxicity and its Relation with Autophagy. In: *Toxicity and Autophagy in Neurodegenerative Disorders* (ed. by Fuentes JM), pp. 159-70. Springer International Publishing.
- Bamburg J.R. & Bernstein B.W. (2008) ADF/cofilin. *Curr Biol* **18**, R273-5.
- Bao E., Sultan K.R., Nowak B. & Hartung J. (2008) Localization of heat shock proteins and histopathological changes in the kidneys of transported pigs. *Livestock Science* **118**, 231-7.
- Bao Q. & Shi Y. (2007) Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ* **14**, 56-65.
- Bauchart C., Remond D., Chambon C., Patureau Mirand P., Savary-Auzeloux I., Reynes C. & Morzel M. (2006) Small peptides (<5kDa) found in ready-to-eat beef meat. *Meat Sci* **74**, 658-66.

- Becila S., Herrera-Mendez C.H., Coulis G., Labas R., Astruc T., Picard B., Boudjellal A., Pelissier P., Bremaud L. & Ouali A. (2010) Postmortem muscle cells die through apoptosis. *European Food Research and Technology* **231**, 485-93.
- Beere H.M. (2004) "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J Cell Sci* **117**, 2641-51.
- Beere H.M. (2005) Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *Journal of Clinical Investigation* **115**, 2633-9.
- Bejerholm C., Tørngren M.A. & Aaslyng M.D. (2014) COOKING OF MEAT | Cooking of Meat. In: *Encyclopedia of Meat Sciences (Second Edition)* (eds. by Dikeman M & Devine C), pp. 370-6. Academic Press, Oxford.
- Belizario J.E., Lorite M.J. & Tisdale M.J. (2001) Cleavage of caspases-1, -3, -6, -8 and -9 substrates by proteases in skeletal muscles from mice undergoing cancer cachexia. *Br J Cancer* **84**, 1135-40.
- Bendall J. (1973) Postmortem changes in muscle. *The structure and function of muscle* **2**, 244-309.
- Bendixen E. (2005) The use of proteomics in meat science. *Meat Sci* **71**, 138-49.
- Bendixen E. (2013) Understanding the Proteome. In: *Proteomics in Foods* (eds. by Toldrá F & Nollet LML), pp. 3-19. Springer US.
- 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**, 5229-37.
- Bestervelt L.L., Vaz A.D. & Coon M.J. (1995) Inactivation of ethanol-inducible cytochrome P450 and other microsomal P450 isozymes by trans-4-hydroxy-2-nonenal, a major product of membrane lipid peroxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**, 3764-8.
- Bervers E.M., Comfurius P. & Zwaal R.F. (1996) Regulatory mechanisms in maintenance and modulation of transmembrane lipid asymmetry: pathophysiological implications. *Lupus* **5**, 480-7.
- Bervers E.M. & Williamson P.L. (2010) Phospholipid scramblase: an update. *FEBS Lett* **584**, 2724-30.
- Biral D., Jakubiec-Puka A., Ciechomska I., Sandri M., Rossini K., Carraro U. & Betto R. (2000) Loss of dystrophin and some dystrophin-associated proteins with concomitant signs of apoptosis in rat leg muscle overworked in extension. *Acta Neuropathologica* **100**, 618-26.
- Bizat N., Hermel J.M., Humbert S., Jacquard C., Creminon C., Escartin C., Saudou F., Krajewski S., Hantraye P. & Brouillet E. (2003) In vivo calpain/caspase cross-talk during 3-nitropropionic acid-induced striatal degeneration: implication of a calpain-mediated cleavage of active caspase-3. *J Biol Chem* **278**, 43245-53.
- Bjarnadottir S.G., Hollung K., Faergestad E.M. & Veiseth-Kent E. (2010) Proteome changes in bovine longissimus thoracis muscle during the first 48 h postmortem: shifts in energy status and myofibrillar stability. *J Agric Food Chem* **58**, 7408-14.
- Bjarnadottir S.G., Hollung K., Hoy M., Bendixen E., Codrea M.C. & Veiseth-Kent E. (2012) Changes in protein abundance between tender and tough meat from bovine longissimus thoracis muscle assessed by isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation (iTRAQ) and 2-dimensional gel electrophoresis analysis. *J Anim Sci* **90**, 2035-43.
- Blanchet X., Pere-Brissaud A., Duprat N., Pinault E., Delourme D., Ouali A., Combet C., Maftah A., Pelissier P. & Bremaud L. (2012) Mutagenesis of the bovSERPINA3-3 demonstrates the requirement of aspartate-371 for intermolecular interaction and formation of dimers. *Protein Sci* **21**, 977-86.

- Boggess M.V., Lippolis J.D., Hurkman W.J., Fagerquist C.K., Briggs S.P., Gomes A.V., Righetti P.G. & Bala K. (2013) The need for agriculture phenotyping: "moving from genotype to phenotype". *J Proteomics* **93**, 20-39.
- Boleman S.J., Boleman S.L., Miller R.K., Taylor J.F., Cross H.R., Wheeler T.L., Koohmaraie M., Shackelford S.D., Miller M.F., West R.L., Johnson D.D. & Savell J.W. (1997) Consumer evaluation of beef of known categories of tenderness. *J Anim Sci* **75**, 1521-4.
- Bonifati V., Rizzu P., Squitieri F., Krieger E., Vanacore N., van Swieten J.C., Brice A., van Duijn C.M., Oostra B., Meco G. & Heutink P. (2003a) DJ-1(PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. *Neurological Sciences* **24**, 159-60.
- Bonifati V., Rizzu P., van Baren M.J., Schaap O., Breedveld G.J., Krieger E., Dekker M.C.J., Squitieri F., Ibanez P., Joosse M., van Dongen J.W., Vanacore N., van Swieten J.C., Brice A., Meco G., van Duijn C.M., Oostra B.A. & Heutink P. (2003b) Mutations in the DJ-1 Gene Associated with Autosomal Recessive Early-Onset Parkinsonism. *Science* **299**, 256-9.
- Bonny S.P., Gardner G.E., Pethick D.W., Legrand I., Polkinghorne R.J. & Hocquette J.F. (2015) Biochemical measurements of beef are a good predictor of untrained consumer sensory scores across muscles. *Animal* **9**, 179-90.
- Borla O.P., Martone C.B. & Sánchez J.J. (1998) Protease I Inhibitor System in Fish Muscle: A Comparative Study. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **119**, 101-5.
- Boudechicha H.R., Gagaoua M., Hafid K., Becila S., Boudjellal A. & Astruc T. (2015) Khliaa Ezir, a traditional cured meat product of Algeria: Preparation and characterization In: *Proceedings of the 61th International Congress of Meat Science and Meat Technology*, pp. 1-4, Clermont-Ferrand, France.
- Boudida Y., Becila S., Gagaoua M., Boudjellal A., Sentandreu M. & Ouali A. (2015) Muscle to meat conversion in common carp (*Cyprinus carpio*): new insights involving apoptosis. In: *Proceedings of the 61th International Congress of Meat Science and Meat Technology*, pp. 1-4, Clermont-Ferrand, France
- Boudier C. & Bieth J.G. (2001) The Reaction of Serpins with Proteinases Involves Important Enthalpy Changes. *Biochemistry* **40**, 9962-7.
- Boudjellal A., Becila S., Coulis G., Herrera-Mendez C.H., Aubry L., Lepetit J., Harhoura K., Sentandreu M.A., Ait-Amar H. & Ouali A. (2008) Is the pH drop profile curvilinear and either monophasic or polyphasic? Consequences on the ultimate bovine meat texture. *African Journal of Agricultural Research* **3**, 195-204.
- Bouley J., Chambon C. & Picard B. (2004) Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* **4**, 1811-24.
- Bouley J., Meunier B., Chambon C., De Smet S., Hocquette J.F. & Picard B. (2005) Proteomic analysis of bovine skeletal muscle hypertrophy. *Proteomics* **5**, 490-500.
- Bourguet C., Deiss V., Boissy A. & Terlouw E.M.C. (2015) Young Blond d'Aquitaine, Angus and Limousin bulls differ in emotional reactivity: Relationships with animal traits, stress reactions at slaughter and post-mortem muscle metabolism. *Applied Animal Behaviour Science* **164**, 41-55.
- Bouton P.E., Carrol F.D., Harris P.V. & Shorthose W.R. (1973) INFLUENCE OF pH AND FIBER CONTRACTION STATE UPON FACTORS AFFECTING THE TENDERNESS OF BOVINE MUSCLE. *Journal of Food Science* **38**, 404-7.

- Bouton P.E., Harris P.V., Macfarlane J.J. & Shorthose W.R. (1982) Influence of pH on the Warner-Bratzler shear properties of mutton. *Meat Science* **6**, 27-36.
- Bowers J.A., Dikeman M.E., Murray L. & Stroda S.L. (2012) Cooked yields, color, tenderness, and sensory traits of beef roasts cooked in an oven with steam generation versus a commercial convection oven to different endpoint temperatures. *Meat Sci* **92**, 97-106.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Brandebourg T. (2013) 1 Growth of Muscle from the Myoblast to Whole Muscle. *The Science of Meat Quality*, 1-27.
- Bratton D.L., Fadok V.A., Richter D.A., Kailey J.M., Guthrie L.A. & Henson P.M. (1997) Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* **272**, 26159-65.
- Briand M., Talmant A., Briand Y., Monin G. & Durand R. (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.
- Brocker C., Cantore M., Failli P. & Vasiliou V. (2011) Aldehyde dehydrogenase 7A1 (ALDH7A1) attenuates reactive aldehyde and oxidative stress induced cytotoxicity. *Chem Biol Interact* **191**, 269-77.
- Brocker C., Lassen N., Estey T., Pappa A., Cantore M., Orlova V.V., Chavakis T., Kavanagh K.L., Oppermann U. & Vasiliou V. (2010) Aldehyde dehydrogenase 7A1 (ALDH7A1) is a novel enzyme involved in cellular defense against hyperosmotic stress. *J Biol Chem* **285**, 18452-63.
- Brooke M.H. & Kaiser K.K. (1970) Muscle fiber types: How many and what kind? *Archives of Neurology* **23**, 369-79.
- Brown S.B., Bailey K. & Savill J. (1997) Actin is cleaved during constitutive apoptosis. *Biochem J* **323 (Pt 1)**, 233-7.
- Bruey J.-M., Ducasse C., Bonniaud P., Ravagnan L., Susin S.A., Diaz-Latoud C., Gurbuxani S., Arrigo A.-P., Kroemer G., Solary E. & Garrido C. (2000) Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol* **2**, 645-52.
- Brunelle J.L. & Green R. (2014) Chapter Thirteen - Coomassie Blue Staining. In: *Methods in Enzymology* (ed. by Jon L), pp. 161-7. Academic Press.
- Buja L.M., Eigenbrodt M.L. & Eigenbrodt E.H. (1993) Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Arch Pathol Lab Med* **117**, 1208-14.
- Burke J. & Dennis E. (2009) Phospholipase A2 Biochemistry. *Cardiovascular Drugs and Therapy* **23**, 49-59.
- Bursch W., Hohegger K., Torok L., Marian B., Ellinger A. & Hermann R.S. (2000) Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments. *J Cell Sci* **113 (Pt 7)**, 1189-98.
- Cali T., Ottolini D. & Brini M. (2012) Mitochondrial Ca²⁺ as a Key Regulator of Mitochondrial Activities. In: *Advances in Mitochondrial Medicine* (eds. by Scatena R, Bottoni P & Giardina B), pp. 53-73. Springer Netherlands.
- Campo M.M., Nute G.R., Hughes S.I., Enser M., Wood J.D. & Richardson R.I. (2006) Flavour perception of oxidation in beef. *Meat Science* **72**, 303-11.

- Canet-Avilés R.M., Wilson M.A., Miller D.W., Ahmad R., McLendon C., Bandyopadhyay S., Baptista M.J., Ringe D., Petsko G.A. & Cookson M.R. (2004) The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9103-8.
- Canto A.C., Suman S.P., Nair M.N., Li S., Rentfrow G., Beach C.M., Silva T.J., Wheeler T.L., Shackelford S.D., Grayson A., McKeith R.O. & King D.A. (2015) Differential abundance of sarcoplasmic proteome explains animal effect on beef Longissimus lumborum color stability. *Meat Sci* **102**, 90-8.
- Cao J.-X., Ou C.-R., Zou Y.-F., Ye K.-P., Zhang Q.-Q., Khan M.A., Pan D.-D. & Zhou G. (2013) Activation of caspase-3 and its correlation with shear force in bovine skeletal muscles during postmortem conditioning. *Journal of Animal Science* **91**, 4547-52.
- Cappadona S., Baker P., Cutillas P., Heck A.R. & van Breukelen B. (2012) Current challenges in software solutions for mass spectrometry-based quantitative proteomics. *Amino Acids* **43**, 1087-108.
- Carbone D.L., Doorn J.A., Kiebler Z., Sampey B.P. & Petersen D.R. (2004) Inhibition of Hsp72-mediated protein refolding by 4-hydroxy-2-nonenal. *Chem Res Toxicol* **17**, 1459-67.
- Carlier M.-F. & Pantaloni D. (2010) From Molecules to Movement: In Vitro Reconstitution of Self-Organized Actin-based Motile Processes. In: *Actin-based Motility* (ed. by Carlier M.-F), pp. 237-54. Springer Netherlands.
- Carlson K.B., Pearce S.C., Baumgard L.H., Gabler N.K., Lonergan S.M. & Cruzen S.M. (2015) Heat shock protein response to acute heat stress in the porcine semitendinosus muscle. *Meat Science* **101**, 158.
- Carrell R. & Travis J. (1985) α 1-Antitrypsin and the serpins: variation and countervariation. *Trends in Biochemical Sciences* **10**, 20-4.
- Carrell R.W., Pemberton P.A. & Boswell D.R. (1987) The serpins: evolution and adaptation in a family of protease inhibitors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **52**, 527-35.
- Carrera M., Cañas B. & Gallardo J.M. (2013) The sarcoplasmic fish proteome: Pathways, metabolic networks and potential bioactive peptides for nutritional inferences. *Journal of Proteomics* **78**, 211-20.
- Cassar-Malek I., Hocquette J., Jurie C., Listrat A., Jailler R., Bauchart D., Briand Y. & Picard B. (2004) Muscle-specific metabolic, histochemical and biochemical responses to a nutritionally induced discontinuous growth path. *Animal Science* **79**, 49-59.
- Cassar-Malek I., Picard B., Bernard C. & Hocquette J.F. (2008) Application of gene expression studies in livestock production systems: a European perspective. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **48**, 701.
- Cassens R. (1971) The science of meat and meat products. by JF Price and BS Schweigert, WH Freeman and Co., San Francisco, 11.
- Catherman A.D., Skinner O.S. & Kelleher N.L. (2014) Top Down proteomics: Facts and perspectives. *Biochem Biophys Res Commun* **445**, 683-93.
- Celis J.E., Kruhøffer M., Gromova I., Frederiksen C., Østergaard M., Thykjaer T., Gromov P., Yu J., Pálisdóttir H., Magnusson N. & Ørntoft T.F. (2000) Gene expression profiling: monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics. *FEBS Lett* **480**, 2-16.
- Chang K.C., da Costa N., Blackley R., Southwood O., Evans G., Plastow G., Wood J.D. & Richardson R.I. (2003) Relationships of myosin heavy chain fibre types to meat quality traits in traditional and modern pigs. *Meat Sci* **64**, 93-103.

- Chaze T., Hocquette J.-F., Meunier B., Renand G., Jurie C., Chambon C., Journaux L., Rousset S., Denoyelle C., Lepetit J. & Picard B. (2013) Biological Markers for Meat Tenderness of the Three Main French Beef Breeds Using 2-DE and MS Approach. In: *Proteomics in Foods* (eds. by Toldrá F & Nollet LML), pp. 127-46. Springer US.
- Chaze T., Meunier B., Chambon C., Jurie C. & Picard B. (2009) Proteome dynamics during contractile and metabolic differentiation of bovine foetal muscle. *Animal* **3**, 980-1000.
- Chen F., Chang R., Trivedi M., Capetanaki Y. & Cryns V.L. (2003) Caspase proteolysis of desmin produces a dominant-negative inhibitor of intermediate filaments and promotes apoptosis. *J Biol Chem* **278**, 6848-53.
- Cheng J.-Z., Singhal S.S., Sharma A., Saini M., Yang Y., Awasthi S., Zimniak P. & Awasthi Y.C. (2001) Transfection of mGSTA4 in HL-60 Cells Protects against 4-Hydroxynonenal-Induced Apoptosis by Inhibiting JNK-Mediated Signaling. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **392**, 197-207.
- Chernukha I. & Manyukhin Y. (2015) Identification of Biomarkers of Horse Muscle Tissue Using Proteomic Strategy. *Procedia Food Science* **5**, 46-9.
- Chhabra E.S., Ramabhadran V., Gerber S.A. & Higgs H.N. (2009) INF2 is an endoplasmic reticulum-associated formin protein. *J Cell Sci* **122**, 1430-40.
- Chiarpotto* E., Domenicotti* C., Paola D., Vitali A., Nitti M., Pronzato M.A., Biasi F., Cottalasso D., Marinari U.M., Dragonetti A., Cesaro P., Isidoro C. & Poli G. (1999) Regulation of rat hepatocyte protein kinase C β isoenzymes by the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2,3-nonenal: A signaling pathway to modulate vesicular transport of glycoproteins. *Hepatology* **29**, 1565-72.
- Choi I., Bates R.O., Raney N.E., Steibel J.P. & Ernst C.W. (2012) Evaluation of QTL for carcass merit and meat quality traits in a US commercial Duroc population. *Meat Science* **92**, 132-8.
- Choi W.S., Lee E.H., Chung C.W., Jung Y.K., Jin B.K., Kim S.U., Oh T.H., Saido T.C. & Oh Y.J. (2001) Cleavage of Bax is mediated by caspase-dependent or -independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: protective role of Bcl-2. *J Neurochem* **77**, 1531-41.
- Choi Y.M., Lee S.H., Choe J.H., Rhee M.S., Lee S.K., Joo S.T. & Kim B.C. (2010) Protein solubility is related to myosin isoforms, muscle fiber types, meat quality traits, and postmortem protein changes in porcine longissimus dorsi muscle. *Livestock Science* **127**, 183-91.
- Chriki S., Picard B., Jurie C., Reichstadt M., Micol D., Brun J.P., Journaux L. & Hocquette J.F. (2012) Meta-analysis of the comparison of the metabolic and contractile characteristics of two bovine muscles: longissimus thoracis and semitendinosus. *Meat Sci* **91**, 423-9.
- Chriki S., Renand G., Picard B., Micol D., Journaux L. & Hocquette J.F. (2013) Meta-analysis of the relationships between beef tenderness and muscle characteristics. *Livestock Science* **155**, 424-34.
- Christensen M., Ertbjerg P., Failla S., Sanudo C., Richardson R.I., Nute G.R., Olleta J.L., Panea B., Alberti P., Juarez M., Hocquette J.F. & Williams J.L. (2011) Relationship between collagen characteristics, lipid content and raw and cooked texture of meat from young bulls of fifteen European breeds. *Meat Sci* **87**, 61-5.
- Claiborne A., Yeh J.I., Mallett T.C., Luba J., Crane E.J., 3rd, Charrier V. & Parsonage D. (1999) Protein-sulfenic acids: diverse roles for an unlikely player in enzyme catalysis and redox regulation. *Biochemistry* **38**, 15407-16.

- Clarke A.J., Knight C., Bass J. & Cooper G.J.S. (2001) Identification and characterization of a bovine myosin light chain-1 fast polymorphism. *Proteomics* **1**, 1495-502.
- Clarke E.P., Cates G.A., Ball E.H. & Sanwal B.D. (1991) A collagen-binding protein in the endoplasmic reticulum of myoblasts exhibits relationship with serine protease inhibitors. *J Biol Chem* **266**, 17230-5.
- Clarke P.G.H., Posada A., Primi M.P. & Castagné V. (1998) Neuronal death in the central nervous system during development. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **52**, 356-62.
- Colell A., Ricci J.-E., Tait S., Milasta S., Maurer U., Bouchier-Hayes L., Fitzgerald P., Guio-Carrion A., Waterhouse N.J., Li C.W., Mari B., Barbry P., Newmeyer D.D., Beere H.M. & Green D.R. (2007) GAPDH and Autophagy Preserve Survival after Apoptotic Cytochrome c Release in the Absence of Caspase Activation. *Cell* **129**, 983-97.
- Collura V. & Boissy G. (2007) From Protein—Protein Complexes to Interactomics. In: *Subcellular Proteomics* (eds. by Bertrand E & Faupel M), pp. 135-83. Springer Netherlands.
- Cooper K.D., Pawaskar S. & Ali H. (2015) Identification of Biologically Significant Elements Using Correlation Networks in High Performance Computing Environments. In: *Bioinformatics and Biomedical Engineering* (eds. by Ortuño F & Rojas I), pp. 607-19. Springer International Publishing.
- Cortright R.N., Muoio D.M. & Dohm G.L. (1997) Skeletal muscle lipid metabolism: A frontier for new insights into fuel homeostasis. *J Nutr Biochem* **8**, 228-45.
- Corzo A., Dozier W.A. & Kidd M.T. (2006) Dietary lysine needs of late-developing heavy broilers. *Poultry Science* **85**, 457-61.
- Cox J., Hein M.Y., Luber C.A., Paron I., Nagaraj N. & Mann M. (2014) Accurate Proteome-wide Label-free Quantification by Delayed Normalization and Maximal Peptide Ratio Extraction, Termed MaxLFQ. *Molecular & Cellular Proteomics* **13**, 2513-26.
- Crabb J.W., O'Neil J., Miyagi M., West K. & Hoff H.F. (2002) Hydroxynonenal inactivates cathepsin B by forming Michael adducts with active site residues. *Protein Science* **11**, 831-40.
- Cross H.R., Stanfield M.S. & Koch E.J. (1976) Beef Palatability as Affected by Cooking Rate and Final Internal Temperature¹. *J. Anim. Sci.* **43**, 114-21.
- Cruzen S.M., Pearce S.C., Baumgard L.H., Gabler N.K., Huff-Lonergan E. & Lonergan S.M. (2015) Proteomic changes to the sarcoplasmic fraction of predominantly red or white muscle following acute heat stress. *Journal of Proteomics* **128**, 141-53.
- Culioli J. (1998) La qualité de la viande bovine: aspects biologiques et technologiques de la gestion de la tendreté. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France* **71**, 25-46.
- Cuvelier C., Cabaraux J.F., Dufrasne I., Clinquart A., Hocquette J.F., Istasse L. & Hornick J.-L. (2006a) Performance, slaughter characteristics and meat quality of young bulls from Belgian Blue, Limousin and Aberdeen Angus breeds fattened with a sugar-beet pulp or a cereal-based diet. *Animal Science* **82**, 125-32.
- Cuvelier C., Clinquart A., Hocquette J.F., Cabaraux J.F., Dufrasne I., Istasse L. & Hornick J.L. (2006b) Comparison of composition and quality traits of meat from young finishing bulls from Belgian Blue, Limousin and Aberdeen Angus breeds. *Meat Sci* **74**, 522-31.
- D'Alessandro A., Marrocco C., Rinalducci S., Mirasole C., Failla S. & Zolla L. (2012a) Chianina beef tenderness investigated through integrated Omics. *J Proteomics* **75**, 4381-98.

- D'Alessandro A., Rinalducci S., Marrocco C., Zolla V., Napolitano F. & Zolla L. (2012b) Love me tender: an Omics window on the bovine meat tenderness network. *J Proteomics* **75**, 4360-80.
- D'Alessandro A. & Zolla L. (2013a) Foodomics to investigate meat tenderness. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **52**, 47-53.
- D'Alessandro A. & Zolla L. (2013b) Meat science: From proteomics to integrated omics towards system biology. *J Proteomics* **78**, 558-77.
- D'Alessandro A., Marrocco C., Zolla V., D'Andrea M. & Zolla L. (2011) Meat quality of the longissimus lumborum muscle of Casertana and Large White pigs: Metabolomics and proteomics intertwined. *Journal of Proteomics* **75**, 610-27.
- Dahlmann B., Kuehn L., Rutschmann M., Block J. & Reinauer H. (1981) Characterization of the alkaline proteinases from rat skeletal muscle. *Proteinases and their Inhibitors. Edited by V Turk, U Vitale. Mladinska Knjiga (Pengamon Press), Ljubliana(Oxford)*, 163-17.
- Dalleau S., Baradat M., Gueraud F. & Huc L. (2013) Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. *Cell Death Differ* **20**, 1615-30.
- Damon M., Denieul K., Vincent A., Bonhomme N., Wyszynska-Koko J. & Lebret B. (2013) Associations between muscle gene expression pattern and technological and sensory meat traits highlight new biomarkers for pork quality assessment. *Meat Sci* **95**, 744-54.
- Damon M., Louveau I., Lefaucheur L., Lebret B., Vincent A., Leroy P., Sanchez M.P., Herpin P. & Gondret F. (2006) Number of intramuscular adipocytes and fatty acid binding protein-4 content are significant indicators of intramuscular fat level in crossbred Large White × Duroc pigs. *Journal of Animal Science* **84**, 1083-92.
- Daniel N.N. & Korsmeyer S.J. (2004) Cell death: critical control points. *Cell* **116**, 205-19.
- Desai M.A., Joseph P., Suman S.P., Silva J.L., Kim T. & Schilling M.W. (2014) Proteome basis of red color defect in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fillets. *LWT - Food Science and Technology* **57**, 141-8.
- Deveraux Q.L. & Reed T.C. (1999) IAP family proteins - suppressors of apoptosis. *Genes & Development* **13**, 239-52.
- Di Luca A., Elia G., Hamill R. & Mullen A.M. (2013a) 2D DIGE proteomic analysis of early post mortem muscle exudate highlights the importance of the stress response for improved water-holding capacity of fresh pork meat. *Proteomics* **13**, 1528-44.
- Di Luca A., Elia G., Mullen A.M. & Hamill R.M. (2013b) Monitoring post mortem changes in porcine muscle through 2-D DIGE proteome analysis of Longissimus muscle exudate. *Proteome Sci* **11**, 9.
- Ding W.X., Shen H.M. & Ong C.N. (2002) Calpain activation after mitochondrial permeability transition in microcystin-induced cell death in rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **291**, 321-31.
- Dingova H., Fukalova J., Maninova M., Philimonenko V.V. & Hozak P. (2009) Ultrastructural localization of actin and actin-binding proteins in the nucleus. *Histochem Cell Biol* **131**, 425-34.
- Disanza A., Steffen A., Hertzog M., Frittoli E., Rottner K. & Scita G. (2005) Actin polymerization machinery: the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement. *Cell Mol Life Sci* **62**, 955-70.
- Dlamini Z., Mbita Z. & Zungu M. (2004) Genealogy, expression, and molecular mechanisms in apoptosis. *Pharmacol Ther* **101**, 1-15.

- Doherty M.K., McLean L., Hayter J.R., Pratt J.M., Robertson D.H., El-Shafei A., Gaskell S.J. & Beynon R.J. (2004) The proteome of chicken skeletal muscle: changes in soluble protein expression during growth in a layer strain. *Proteomics* **4**, 2082-93.
- Dransfield E., Martin J.-F., Bauchart D., Abouelkaram S., Lepetit J., Culioli J., Jurie C. & Picard B. (2003) Meat quality and composition of three muscles from French cull cows and young bulls. *Animal Science* **76**, 387-99.
- Dransfield E., Nute G.R., Roberts T.A., Boccard R., Touraille C., Buchter L., Casteels M., Cosentino E., Hood D.E., Joseph R.L., Schon I. & Paardekooper E.J.C. (1984) Beef quality assessed at European research centres. *Meat Science* **10**, 1-20.
- Dubost A. (2012) Propriétés structurales et biochimiques du tissu conjonctif intramusculaire et tendreté de la viande bovine.
- Dubost A., Micol D., Picard B., Lethias C., Andueza D., Bauchart D. & Listrat A. (2013) Structural and biochemical characteristics of bovine intramuscular connective tissue and beef quality. *Meat Sci* **95**, 555-61.
- Duris M.P., Renand G. & Picard B. (1999) Genetic Variability of Foetal Bovine Myoblasts in Primary Culture. *The Histochemical Journal* **31**, 753-60.
- Ekins R., Chu F. & Biggart E. (1989) Development of microspot multi-analyte ratiometric immunoassay using dual fluorescent-labelled antibodies. *Anal Chim Acta* **227**, 73-96.
- England E.M., Scheffler T.L., Kasten S.C., Matarneh S.K. & Gerrard D.E. (2013) Exploring the unknowns involved in the transformation of muscle to meat. *Meat Sci* **95**, 837-43.
- Ernoul E., Gamelin E. & Guette C. (2008) Improved proteome coverage by using iTRAQ labelling and peptide OFFGEL fractionation. *Proteome Science* **6**, 27.
- Escobedo J., Pucci A.M. & Koh T.J. (2004) HSP25 protects skeletal muscle cells against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **37**, 1455-62.
- Essén-Gustavsson B., Karlsson A., Lundström K. & Enfält A.C. (1994) Intramuscular fat and muscle fibre lipid contents in halothane-free pigs fed high or low protein diets and its relation to meat quality. *Meat Science* **38**, 269-77.
- Essén-Gustavsson B., Karlström K. & Lundström K. (1992) Muscle fibre characteristics and metabolic response at slaughter in pigs of different halothane genotypes and their relation to meat quality. *Meat Science* **31**, 1-11.
- Etherington D.J. & Sims T.J. (1981) Detection and estimation of collagen. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **32**, 539-46.
- Evans J.H., Spencer D.M., Zweifach A. & Leslie C.C. (2001) Intracellular Calcium Signals Regulating Cytosolic Phospholipase A2 Translocation to Internal Membranes. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 30150-60.
- Evrat-Georgel C. (2008) Bibliographie critique des méthodes instrumentales et mesure de la tendreté de la viande bovine. *Département technique d'Élevage et Santé, Service Qualité des Viandes: Paris*.
- Faustman C., Liebler D.C., McClure T.D. & Sun Q. (1999) α,β -Unsaturated Aldehydes Accelerate Oxymyoglobin Oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 3140-4.
- Fenn J., Mann M., Meng C., Wong S. & Whitehouse C. (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64-71.

- Fernandez D., Picard B., Sentandreu E., Izquierdo L. & Sentandreu M. (2015) Use of liquid isoelectric focusing (offgel) in the study of muscle proteome as related to meat tenderness. In: 61. *International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST)*, pp. 106-. INRA, Clermont-Ferrand.
- Fernandez X., Monin G., Talmant A., Mourot J. & Lebret B. (1999a) Influence of intramuscular fat content on the quality of pig meat - 1. Composition of the lipid fraction and sensory characteristics of m. longissimus lumborum. *Meat Sci* **53**, 59-65.
- Fernandez X., Monin G., Talmant A., Mourot J. & Lebret B. (1999b) Influence of intramuscular fat content on the quality of pig meat - 2. Consumer acceptability of m. longissimus lumborum. *Meat Sci* **53**, 67-72.
- Fernandez X., Mourot J., Mounier A. & Ecolan P. (1995) Effect of muscle type and food deprivation for 24 hours on the composition of the lipid fraction in muscles of Large White pigs. *Meat Science* **41**, 335-43.
- Ferrari M., Binzoni T. & Quaresima V. (1997) Oxidative metabolism in muscle. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **352**, 677-83.
- Ferrington D.A. & Kapphahn R.J. (2004) Catalytic site-specific inhibition of the 20S proteasome by 4-hydroxynonenal. *FEBS Lett* **578**, 217-23.
- Fesik S.W. & Shi Y. (2001) Structural biology. Controlling the caspases. *Science* **294**, 1477-8.
- Festoff B.W., Rao J.S. & Hantai D. (1991) Plasminogen activators and inhibitors in the neuromuscular system: III. The serpin protease nexin I is synthesized by muscle and localized at neuromuscular synapses. *J Cell Physiol* **147**, 76-86.
- Fibbi G., Barletta E., Dini G., Del Rosso A., Pucci M., Cerletti M. & Del Rosso M. (2001) Cell invasion is affected by differential expression of the urokinase plasminogen activator/urokinase plasminogen activator receptor system in muscle satellite cells from normal and dystrophic patients. *Lab Invest* **81**, 27-39.
- Fidzianska A., Kaminska A. & Glinka Z. (1991) Muscle cell death. Ultrastructural differences between muscle cell necrosis and apoptosis. *Neuropatol Pol* **29**, 19-28.
- Fisher A.B. (2011) Peroxiredoxin 6: a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A(2) activities. *Antioxid Redox Signal* **15**, 831-44.
- Flower T.R., Chesnokova L.S., Froelich C.A., Dixon C. & Witt S.N. (2005) Heat shock prevents alpha-synuclein-induced apoptosis in a yeast model of Parkinson's disease. *J Mol Biol* **351**, 1081-100.
- Folch J., Lees M. & Sloane Stanley G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* **226**, 497-509.
- Font-i-Furnols M. & Guerrero L. (2014) Consumer preference, behavior and perception about meat and meat products: an overview. *Meat Sci* **98**, 361-71.
- Forest K.T., Langford P.R., Kroll J.S. & Getzoff E.D. (2000) Cu, Zn superoxide dismutase structure from a microbial pathogen establishes a class with a conserved dimer interface1. *Journal of Molecular Biology* **296**, 145-53.
- Franco D., Mato A., Salgado F.J., Lopez-Pedrouso M., Carrera M., Bravo S., Parrado M., Gallardo J.M. & Zapata C. (2015) Tackling proteome changes in the longissimus thoracis bovine muscle in response to pre-slaughter stress. *J Proteomics* **122**, 73-85.
- Friedman J. & Alm E.J. (2012) Inferring Correlation Networks from Genomic Survey Data. *PLoS Comput Biol* **8**, e1002687.

- Fritz J.D. & Greaser M.L. (1991) Changes in Titin and Nebulin in Postmortem Bovine Muscle Revealed by Gel Electrophoresis, Western Blotting and Immunofluorescence Microscopy. *Journal of Food Science* **56**, 607-10.
- Fuentes-Prior P. & Salvesen G.S. (2004) The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* **384**, 201-32.
- Gagaoua M., Boudida Y., Becila S., Picard B., Boudjellal A., Sentandreu M.A. & Ouali A. (2012) New Caspases' inhibitors belonging to the serpin superfamily: A novel key control point of apoptosis in mammalian tissues. *Advances in Bioscience and Biotechnology* **03**, 740-50.
- Gagaoua M., Boudjellal A., Becila S., Boudida Y., Herrera-Mendez C.H., Sentandreu M.A. & Ouali A. (2013a) Apoptosis regulation in postmortem muscle: cross-class inhibition of caspases by two bovine serpins. In: *Proceedings of the 59th International Congress of Meat Science and Technology*, p. 4, Izmir, Turkey.
- Gagaoua M., Durand D., Micol D., Santé-Lhoutellier V., Terlouw C., Ellies-Oury M.P., Boudjellal A., Hocquette J.F. & Picard B. (2014) Biomarkers of meat sensory qualities of Angus beef breed: towards the development of prediction equations. In: *15èmes JSMTV*, pp. 137-8. Viandes & Produits Carnés, Clermont-Ferrand.
- Gagaoua M., Hafid K., Boudida Y., Becila S., Ouali A., Picard B., Boudjellal A. & Sentandreu M.A. (2015a) Caspases and Thrombin Activity Regulation by Specific Serpin Inhibitors in Bovine Skeletal Muscle. *Appl Biochem Biotechnol* **177**, 279-303.
- Gagaoua M., Micol D., Richardson R.I., Hocquette J.F., Terlouw E.M.C., Meteau K., Juin H., Moloney A.P., Nuernberg K., Scollan N.D., Boudjellal A. & Picard B. (2013b) Relationships between overall liking score and sensory meat attributes in different types of beef cattle. In: *Proceedings of the 59th International Congress of Meat Science and Technology*, p. 4, Izmir, Turkey.
- Gagaoua M., Terlouw C., Micol D., Boudjellal A., Hocquette J.F. & Picard B. (2015b) Proteomic biomarkers of meat colour of Blonde d'Aquitaine young bulls: towards a better comprehension of the biological mechanisms. In: *Proceedings of the 61th International Congress of Meat Science and Meat Technology*, pp. 1-4, Clermont-Ferrand, France.
- Gagaoua M., Terlouw E.M., Micol D., Boudjellal A., Hocquette J.F. & Picard B. (2015c) Understanding Early Post-Mortem Biochemical Processes Underlying Meat Color and pH Decline in the Longissimus thoracis Muscle of Young Blond d'Aquitaine Bulls Using Protein Biomarkers. *J Agric Food Chem* **63**, 6799-809.
- Gagaoua M., Terlouw E.M.C., Boudjellal A. & Picard B. (2015d) Coherent correlation networks among protein biomarkers of beef tenderness: What they reveal. *J Proteomics* **128**, 365-74.
- Galkin V.E., Orlova A., Kudryashov D.S., Solodukhin A., Reisler E., Schröder G.F. & Egelman E.H. (2011) Remodeling of actin filaments by ADF/cofilin proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 20568-72.
- Gallego M., Mora L., Aristoy M.C. & Toldra F. (2015) Optimisation of a simple and reliable label-free methodology for the relative quantitation of raw pork meat proteins. *Food Chem* **182**, 74-80.
- Gao X., Wu W., Ma C., Li X. & Dai R. (2015) Postmortem changes in sarcoplasmic proteins associated with color stability in lamb muscle analyzed by proteomics. *European Food Research and Technology*, 1-9.
- Garcia-Macia M., Sierra V., Palanca A., Vega-Naredo I., de Gonzalo-Calvo D., Rodriguez-Gonzalez S., Olivan M. & Coto-Montes A. (2014) Autophagy during beef aging. *Autophagy* **10**, 137-43.

- Garcia B.A. (2010) What Does the Future Hold for Top Down Mass Spectrometry? *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **21**, 193-202.
- Garrido C., Gurbuxani S., Ravagnan L. & Kroemer G. (2001) Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* **286**, 433-42.
- Gatellier P., Sayd T., Promeyrat A., Gobert M., Chambon C. & Santé-Lhoutellier V. (2014) Identification de marqueurs protéomiques prédictifs de l'oxydation des viandes. *Viandes & Produits Carnés VPC-2014-30-2-2*, 1-5.
- Geay Y., Bauchart D., Hocquette J.F. & Culioli J. (2001) Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. *Reprod Nutr Dev* **41**, 1-26.
- Geay Y. & Renand G. (1994) Importance de la variabilité génétique et du mode d'élevage des bovins sur les caractéristiques musculaires et les qualités organoleptiques de leurs viandes. *Renc. Rech. Rum*, 177-82.
- Gebriel M., Uleberg K.E., Larssen E., Bjornstad A.H., Sivertsvik M. & Moller S.G. (2010) Cod (*Gadus morhua*) muscle proteome cataloging using 1D-PAGE protein separation, nano-liquid chromatography peptide fractionation, and linear trap quadrupole (LTQ) mass spectrometry. *J Agric Food Chem* **58**, 12307-12.
- Gerrard D.E., Jones S.J., Aberle E.D., Lemenager R.P., Diekman M.A. & Judge M.D. (1987) Collagen Stability, Testosterone Secretion and Meat Tenderness in Growing Bulls and Steers. *Journal of Animal Science* **65**, 1236-42.
- Gettins P.G. (2002) Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev* **102**, 4751-804.
- Gettins P.G. (2007) Mechanisms of serpin inhibition. *Molecular and cellular aspects of the serpinopathies and disorders in serpin activity*. World Scientific, New Jersey, 67-100.
- Glancy B. & Balaban R.S. (2012) Role of mitochondrial Ca²⁺ in the regulation of cellular energetics. *Biochemistry* **51**, 2959-73.
- Gobert M., Gruffat D., Habeanu M., Parafita E., Bauchart D. & Durand D. (2010) Plant extracts combined with vitamin E in PUFA-rich diets of cull cows protect processed beef against lipid oxidation. *Meat Science* **85**, 676-83.
- Gobert M., Martin B., Ferlay A., Chilliard Y., Graulet B., Pradel P., Bauchart D. & Durand D. (2009) Plant polyphenols associated with vitamin E can reduce plasma lipoperoxidation in dairy cows given n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Dairy Sci* **92**, 6095-104.
- Gobert M., Sayd T., Gatellier P. & Sante-Lhoutellier V. (2014) Application to proteomics to understand and modify meat quality. *Meat Sci* **98**, 539-43.
- Gomes C.L., Pflanzner S.B., Cruz A.G., de Felício P.E. & Bolini H.M.A. (2014a) Sensory descriptive profiling and consumer preferences of beef strip loin steaks. *Food Research International* **59**, 76-84.
- Gomes C.L., Pflanzner S.B., de Felício P.E. & Bolini H.M.A. (2014b) Temporal changes of tenderness and juiciness of beef strip loin steaks. *LWT - Food Science and Technology* **59**, 629-34.
- Gong D., Zhang H. & Hu S. (2013) Mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 activation and cardioprotection. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **55**, 58-63.
- Görg A., Boguth G., Köpf A., Reil G., Parlar H. & Weiss W. (2002) Sample prefractionation with Sephadex isoelectric focusing prior to narrow pH range two-dimensional gels. *Proteomics* **2**, 1652-7.
- Görg A., Weiss W. & Dunn M.J. (2004) Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* **4**, 3665-85.

- Gotoh T., Albrecht E., Teuscher F., Kawabata K., Sakashita K., Iwamoto H. & Wegner J. (2009) Differences in muscle and fat accretion in Japanese Black and European cattle. *Meat Science* **82**, 300-8.
- Gotoh T., Terada K., Oyadomari S. & Mori M. (2004) hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death Differ* **11**, 390-402.
- Gourlay C.W. & Ayscough K.R. (2005) The actin cytoskeleton: a key regulator of apoptosis and ageing? *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 583-9.
- Green D.R. & Reed J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309-12.
- Grunert K.G., Bredahl L. & Brunsø K. (2004) Consumer perception of meat quality and implications for product development in the meat sector—a review. *Meat Science* **66**, 259-72.
- Guignot F. (1992) Acidification post mortem dans le muscle de veau. Conséquences sur la structure et sur les qualités organoleptiques de la viande.
- Guignot F., Vignon X. & Monin G. (1993) Post mortem evolution of myofilament spacing and extracellular space in veal muscle. *Meat Sci* **33**, 333-47.
- Guillemin N., Bonnet M., Jurie C. & Picard B. (2011a) Functional analysis of beef tenderness. *J Proteomics* **75**, 352-65.
- Guillemin N., Jurie C., Cassar-Malek I., Hocquette J.F., Renand G. & Picard B. (2011b) Variations in the abundance of 24 protein biomarkers of beef tenderness according to muscle and animal type. *Animal* **5**, 885-94.
- Guillemin N., Jurie C., Renand G., Hocquette J.F., Micol D., Lepetit J. & Picard B. (2012) Different phenotypic and proteomic markers explain variability of beef tenderness across muscles. *Int. J. Biol* **4**, 26-38.
- Gygi S.P., Corthals G.L., Zhang Y., Rochon Y. & Aebersold R. (2000) Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 9390-5.
- Hafid K., Gagaoua M., Boudechicha H.R., Becila S. & Boudjellal A. (2015) A comparison of the carcass and meat quality of ISA (F15) spent hens at two different ages. In: *Proceedings of the 61th International Congress of Meat Science and Meat Technology*, pp. 1-4, Clermont-Ferrand, France.
- Hamelin M., Sayd T., Chambon C., Bouix J., Bibé B., Milenkovic D., Leveziel H., Georges M., Clop A., Marinova P. & Laville E. (2006) Proteomic analysis of ovine muscle hypertrophy. *Journal of Animal Science* **84**, 3266-76.
- Hamill R.M., Marcos B., Rai D.K. & Mullen A.M. (2012a) 11 Omics Approaches. *OMICs Technologies: Tools for Food Science*, 249.
- Hamill R.M., McBryan J., McGee C., Mullen A.M., Sweeney T., Talbot A., Cairns M.T. & Davey G.C. (2012b) Functional analysis of muscle gene expression profiles associated with tenderness and intramuscular fat content in pork. *Meat Sci* **92**, 440-50.
- Harper G.S., Allingham P.G. & Le Feuvre R.P. (1999) Changes in connective tissue of M. semitendinosus as a response to different growth paths in steers. *Meat Sci* **53**, 107-14.
- Haslbeck M., Miess A., Stromer T., Walter S. & Buchner J. (2005) Disassembling protein aggregates in the yeast cytosol. The cooperation of Hsp26 with Ssa1 and Hsp104. *J Biol Chem* **280**, 23861-8.

- Hedegaard J., Horn P., Lametsch R., Søndergaard Møller H., Roepstorff P., Bendixen C. & Bendixen E. (2004) UDP-Glucose pyrophosphorylase is upregulated in carriers of the porcine RN- mutation in the AMP-activated protein kinase. *Proteomics* **4**, 2448-54.
- Heinrich M., Neumeyer J., Jakob M., Hallas C., Tchikov V., Winoto-Morbach S., Wickel M., Schneider-Brachert W., Trauzold A., Hethke A. & Schutze S. (2004) Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death Differ* **11**, 550-63.
- Henzel W.J., Watanabe C. & Stults J.T. (2003) Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **14**, 931-42.
- Herrera-Mendez C.H., Becila S., Blanchet X., Pelissier P., Delourme D., Coulis G., Sentandreu M.A., Boudjellal A., Bremaud L. & Ouali A. (2009) Inhibition of human initiator caspase 8 and effector caspase 3 by cross-class inhibitory bovSERPINA3-1 and A3-3. *FEBS Lett* **583**, 2743-8.
- Herrera-Mendez C.H., Becila S., Boudjellal A. & Ouali A. (2006a) Meat ageing : Reconsideration of the current concept. *Trends in Food Science and Technology* **17**, 394-405.
- Herrera-Mendez C.H., Bremaud L., Coulis G., Pelissier P., Sentandreu M.A., Aubry L., Delourme D., Chambon C., Maftah A., Leveziel H. & Ouali A. (2006b) Purification of the skeletal muscle protein Endopin 1B and characterization of the genes encoding Endopin 1A and 1B isoforms. *FEBS Lett* **580**, 3477-84.
- Hillenkamp F., Karas M., Beavis R.C. & Chait B.T. (1991) Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biopolymers. *Anal Chem* **63**, 1193A-203A.
- Hirayoshi K., Kudo H., Takechi H., Nakai A., Iwamatsu A., Yamada K.M. & Nagata K. (1991) HSP47: a tissue-specific, transformation-sensitive, collagen-binding heat shock protein of chicken embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol* **11**, 4036-44.
- Ho C.Y., Stromer M.H. & Robson R.M. (1994) Identification of the 30 kDa polypeptide in post mortem skeletal muscle as a degradation product of troponin-T. *Biochimie* **76**, 369-75.
- Hoch T., Begon C., Cassar-Malek I., Picard B. & Savary-Auzeloux I. (2003) Mécanismes et conséquences de la croissance compensatrice chez les ruminants. *Productions animales* **16**, 49-59.
- Hocquette J.-F. & Renand G. (2006) The potential benefits of genetics and genomics to improve beef quality-a review. *Animal Science Papers and Reports* **24**, 173-86.
- Hocquette J.F. (2005) Where are we in genomics? *Journal of Physiology and Pharmacology* **56**, 37-70.
- Hocquette J.F., Botreau R., Legrand I., Polkinghorne R., Pethick D.W., Lherm M., Picard B., Doreau M. & Terlouw E.M.C. (2014) Win-win strategies for high beef quality, consumer satisfaction, and farm efficiency, low environmental impacts and improved animal welfare. *Animal Production Science* **54**, 1537-48.
- Hocquette J.F., Botreau R., Picard B., Jacquet A., Pethick D.W. & Scollan N.D. (2012) Opportunities for predicting and manipulating beef quality. *Meat Sci* **92**, 197-209.
- Hocquette J.F., Gondret F., Baeza E., Medale F., Jurie C. & Pethick D.W. (2010) Intramuscular fat content in meat-producing animals: development, genetic and nutritional control, and identification of putative markers. *Animal* **4**, 303-19.
- Hocquette J.F., Lehnert S., Barendse W., Cassar-Malek I. & Picard B. (2007) Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. *Animal* **1**, 159-73.

- Hocquette J.F., Ortigues-Marty I., Pethick D., Herpin P. & Fernandez X. (1998) Nutritional and hormonal regulation of energy metabolism in skeletal muscles of meat-producing animals. *Livestock Production Science* **56**, 115-43.
- Holdstock J., Aalhus J.L., Uttaro B.A., López-Campos Ó., Larsen I.L. & Bruce H.L. (2014) The impact of ultimate pH on muscle characteristics and sensory attributes of the longissimus thoracis within the dark cutting (Canada B4) beef carcass grade. *Meat Science* **98**, 842-9.
- Hollung K., Grove H., Faergestad E.M., Sidhu M.S. & Berg P. (2009) Comparison of muscle proteome profiles in pure breeds of Norwegian Landrace and Duroc at three different ages. *Meat Sci* **81**, 487-92.
- Hollung K., Timperio A.M., Olivan M., Kemp C., Coto-Montes A., Sierra V. & Zolla L. (2014) Systems biology: a new tool for farm animal science. *Curr Protein Pept Sci* **15**, 100-17.
- Hollung K., Veiseth E., Jia X., Faergestad E.M. & Hildrum K.I. (2007) Application of proteomics to understand the molecular mechanisms behind meat quality. *Meat Sci* **77**, 97-104.
- Honikel K.O. & Hamm R. (1994) Measurement of water-holding capacity and juiciness. In: *Quality Attributes and their Measurement in Meat, Poultry and Fish Products* (eds. by Pearson AM & Dutson TR), pp. 125-61. Springer US.
- Hornemann T., Kempa S., Himmel M., Hayess K., Furst D.O. & Wallimann T. (2003) Muscle-type creatine kinase interacts with central domains of the M-band proteins myomesin and M-protein. *J Mol Biol* **332**, 877-87.
- Hornemann T., Stolz M. & Wallimann T. (2000) Isoenzyme-Specific Interaction of Muscle-Type Creatine Kinase with the Sarcomeric M-Line Is Mediated by Nh2-Terminal Lysine Charge-Clamps. *J Cell Biol* **149**, 1225-34.
- Hortigón-Vinagre M.P., Chardonnet S., Montigny C., Gutiérrez-Martín Y., Champeil P. & Henao F. (2011) Inhibition by 4-hydroxynonenal (HNE) of Ca²⁺ transport by SERCA1a: Low concentrations of HNE open protein-mediated leaks in the membrane. *Free Radical Biology and Medicine* **50**, 1700-13.
- Hotchkiss R.S., Strasser A., McDunn J.E. & Swanson P.E. (2009) Cell Death. *New England Journal of Medicine* **361**, 1570-83.
- Hsu J.-L., Huang S.-Y., Chow N.-H. & Chen S.-H. (2003) Stable-Isotope Dimethyl Labeling for Quantitative Proteomics. *Anal Chem* **75**, 6843-52.
- Huang F., Huang M., Zhang H., Zhang C., Zhang D. & Zhou G. (2016) Changes in apoptotic factors and caspase activation pathways during the postmortem aging of beef muscle. *Food Chem* **190**, 110-4.
- Huang H., Larsen M.R., Karlsson A.H., Pomponio L., Costa L.N. & Lametsch R. (2011) Gel-based phosphoproteomics analysis of sarcoplasmic proteins in postmortem porcine muscle with pH decline rate and time differences. *Proteomics* **11**, 4063-76.
- Huang H., Larsen M.R. & Lametsch R. (2012) Changes in phosphorylation of myofibrillar proteins during postmortem development of porcine muscle. *Food Chemistry* **134**, 1999-2006.
- Huang H., Larsen M.R., Palmisano G., Dai J. & Lametsch R. (2014) Quantitative phosphoproteomic analysis of porcine muscle within 24h postmortem. *J Proteomics* **106**, 125-39.
- Huff-Lonergan E. & Lonergan S.M. (2005) Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Science* **71**, 194-204.
- Huff-Lonergan E., Parrish F.C. & Robson R.M. (1995) Effects of postmortem aging time, animal age, and sex on degradation of titin and nebulin in bovine longissimus muscle. *Journal of Animal Science* **73**, 1064-73.

- Huff Lonergan E., Zhang W. & Lonergan S.M. (2010) Biochemistry of postmortem muscle - lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat Sci* **86**, 184-95.
- Huffman K.L., Miller M.F., Hoover L.C., Wu C.K., Brittin H.C. & Ramsey C.B. (1996) Effect of beef tenderness on consumer satisfaction with steaks consumed in the home and restaurant. *J Anim Sci* **74**, 91-7.
- Hughes J.M., Oiseth S.K., Purslow P.P. & Warner R.D. (2014) A structural approach to understanding the interactions between colour, water-holding capacity and tenderness. *Meat Sci* **98**, 520-32.
- Hulka B. (1990) Overview of biological markers. *Biological Markers in Epidemiology*, Oxford University Press, New York, 3-14.
- Hunt L.T. & Dayhoff M.O. (1980) A surprising new protein superfamily containing ovalbumin, antithrombin-III, and alpha 1-proteinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* **95**, 864-71.
- Huntington J.A. (2011) Serpin structure, function and dysfunction. *J Thromb Haemost* **9**, 26-34
- Huntington J.A., Read R.J. & Carrell R.W. (2000) Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature* **407**, 923-6.
- Hwang I.H., Park B.Y., Kim J.H., Cho S.H. & Lee J.M. (2005) Assessment of postmortem proteolysis by gel-based proteome analysis and its relationship to meat quality traits in pig longissimus. *Meat Sci* **69**, 79-91.
- Im H., Seo E.J. & Yu M.H. (1999) Metastability in the inhibitory mechanism of human alpha1-antitrypsin. *J Biol Chem* **274**, 11072-7.
- Immenschuh S. & Baumgart-Vogt E. (2005) Peroxiredoxins, Oxidative Stress, and Cell Proliferation. *Antioxidants & Redox Signaling* **7**, 768-77.
- Institute S. (2002) PROC user's manual, version 9.1. SAS Institute Cary, NC.
- Irving J.A., Pike R.N., Dai W., Bromme D., Worrall D.M., Silverman G.A., Coetzer T.H., Dennison C., Bottomley S.P. & Whisstock J.C. (2002) Evidence that serpin architecture intrinsically supports papain-like cysteine protease inhibition: engineering alpha(1)-antitrypsin to inhibit cathepsin proteases. *Biochemistry* **41**, 4998-5004.
- Irving J.A., Pike R.N., Lesk A.M. & Whisstock J.C. (2000) Phylogeny of the Serpin Superfamily: Implications of Patterns of Amino Acid Conservation for Structure and Function. *Genome Research* **10**, 1845-64.
- ISO I. (2010) 8589 Sensory analysis: general guidance for the design of test rooms. *Ente Nazionale Italiano di Unificazione. Italy*.
- Jensen O.N., Larsen M.R. & Roepstorff P. (1998) Mass spectrometric identification and microcharacterization of proteins from electrophoretic gels: Strategies and applications. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **33**, 74-89.
- Jeremiah L.E. & Gibson L.L. (2003) The effects of postmortem product handling and aging time on beef palatability. *Food Research International* **36**, 929-41.
- Jia X., Ekman M., Grove H., Faergestad E.M., Aass L., Hildrum K.I. & Hollung K. (2007) Proteome changes in bovine longissimus thoracis muscle during the early postmortem storage period. *J Proteome Res* **6**, 2720-31.
- Jia X., Hildrum K.I., Westad F., Kummen E., Aass L. & Hollung K. (2006a) Changes in enzymes associated with energy metabolism during the early post mortem period in longissimus thoracis bovine muscle analyzed by proteomics. *J Proteome Res* **5**, 1763-9.
- Jia X., Hollung K., Therkildsen M., Hildrum K.I. & Bendixen E. (2006b) Proteome analysis of early post-mortem changes in two bovine muscle types: M. longissimus dorsi and M. semitendinosus. *Proteomics* **6**, 936-44.

- Jia X., Veiseth-Kent E., Grove H., Kuziora P., Aass L., Hildrum K.I. & Hollung K. (2009) Peroxiredoxin-6--a potential protein marker for meat tenderness in bovine longissimus thoracis muscle. *J Anim Sci* **87**, 2391-9.
- Jones S.J., Starkey D.L., Calkins C.R. & Crouse J.D. (1990) Myofibrillar protein turnover in feed-restricted and realimented beef cattle. *Journal of Animal Science* **68**, 2707-15.
- Joseph J.K., Awosanya B., Adeniran A.T. & Otagba U.M. (1997) The effects of end-point internal cooking temperatures on the meat quality attributes of selected Nigerian poultry meats. *Food Quality and Preference* **8**, 57-61.
- Joseph P., Nair M.N. & Suman S.P. (2015) Application of proteomics to characterize and improve color and oxidative stability of muscle foods. *Food Research International* **76**, 938-45.
- Joseph P., Suman S.P., Rentfrow G., Li S. & Beach C.M. (2012) Proteomics of muscle-specific beef color stability. *J Agric Food Chem* **60**, 3196-203.
- Jurie C., Listrat A., Giraud X., Picard B., Geay Y. & Hocquette J. (1999) Influence du niveau de croissance et de la nature de l'alimentation sur les caractéristiques musculaires de boeufs Charolais de 20 mois. *Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants* **9**, 259.
- Jurie C., Martin J.-F., Listrat A., Jailler R., Culioli J. & Picard B. (2005) Effects of age and breed of beef bulls on growth parameters, carcass and muscle characteristics. *Animal Science* **80**, 257-63.
- Jurie C., Ortigues-Marty I., Picard B., Micol D. & Hocquette J.F. (2006) The separate effects of the nature of diet and grazing mobility on metabolic potential of muscles from Charolais steers. *Livestock Science* **104**, 182-92.
- Jurie C., Picard B., Hocquette J.F., Dransfield E., Micol D. & Listrat A. (2007) Muscle and meat quality characteristics of Holstein and Salers cull cows. *Meat Sci* **77**, 459-66.
- Jurie C., Picard B., Micol D., Listrat A., Kammoun M. & Hocquette J.F. (2011) Muscle characteristics from young bulls of different beef breeds. In: *57th International Congress of Meat Science and Technology*, Ghent - Belgium.
- Jurie C., Robelin J., Picard B. & Geay Y. (1995) Post-natal changes in the biological characteristics of Semitendinosus muscle in male Limousin cattle. *Meat Sci* **41**, 125-35.
- Kabsch W., Mannherz H.G., Suck D., Pai E.F. & Holmes K.C. (1990) Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* **347**, 37-44.
- Kagan V.E., Fabisiak J.P., Shvedova A.A., Tyurina Y.Y., Tyurin V.A., Schor N.F. & Kawai K. (2000) Oxidative signaling pathway for externalization of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis. *FEBS Lett* **477**, 1-7.
- Kaiser H. (1974) An index of factorial simplicity. *Psychometrika* **39**, 31-6.
- Kambadur R., Sharma M., Smith T.P.L. & Bass J.J. (1997) Mutations in myostatin (GDF8) in Double-Muscled Belgian Blue and Piedmontese Cattle. *Genome Research* **7**, 910-5.
- Karamichou E., Richardson R.I., Nute G.R., Wood J.D. & Bishop S.C. (2007) Genetic analyses of sensory characteristics and relationships with fatty acid composition in the meat from Scottish Blackface lambs. *Animal* **1**, 1524-31.
- Karas M. & Hillenkamp F. (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* **60**, 2299-301.

- Karlsson A.H., Klont R.E. & Fernandez X. (1999) Skeletal muscle fibres as factors for pork quality. *Livestock Production Science* **60**, 255-69.
- Kaufmann S.H., Mesner P.W., Samejima Jr K., Toné S. & Earnshaw W.C. (2000) [1] - Detection of DNA Cleavage in Apoptotic Cells. In: *Methods in Enzymology* (ed. by John CR), pp. 3-15. Academic Press.
- Kaul S.C., Deocaris C.C. & Wadhwa R. (2007) Three faces of mortalin: a housekeeper, guardian and killer. *Exp Gerontol* **42**, 263-74.
- Kavran J.M. & Leahy D.J. (2014) Chapter Fourteen - Silver Staining of SDS-polyacrylamide Gel. In: *Methods in Enzymology* (ed. by Jon L), pp. 169-76. Academic Press.
- Kayalar C., Ord T., Testa M.P., Zhong L.T. & Bredesen D.E. (1996) Cleavage of actin by interleukin 1 beta-converting enzyme to reverse DNase I inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 2234-8.
- Keith F.K.M., Vol D.L.D., Miles R.S., Bechtel P.J. & Carr T.R. (1985) Chemical and Sensory Properties of Thirteen Major Beef Muscles. *Journal of Food Science* **50**, 869-72.
- Kemp C.M., Bardsley R.G. & Parr T. (2006) Changes in caspase activity during the postmortem conditioning period and its relationship to shear force in porcine longissimus muscle. *J Anim Sci* **84**, 2841-6.
- Kemp C.M., King D.A., Shackelford S.D., Wheeler T.L. & Koohmaraie M. (2009) The caspase proteolytic system in callipyge and normal lambs in longissimus, semimembranosus, and infraspinatus muscles during postmortem storage. *J Anim Sci* **87**, 2943-51.
- Kemp C.M. & Parr T. (2012) Advances in apoptotic mediated proteolysis in meat tenderisation. *Meat Sci* **92**, 252-9.
- Kemp C.M., Sensky P.L., Bardsley R.G., Buttery P.J. & Parr T. (2010) Tenderness--an enzymatic view. *Meat Sci* **84**, 248-56.
- Kemp C.M. & Wheeler T.L. (2011) Effects of manipulation of the caspase system on myofibrillar protein degradation in vitro. *J Anim Sci* **89**, 3262-71.
- Kerr J.F., Wyllie A.H. & Currie A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-57.
- Khalkhali-Ellis Z. (2006) Maspin: the new frontier. *Clin Cancer Res* **12**, 7279-83.
- Kim G.D., Jeong J.Y., Moon S.H., Hwang Y.H. & Joo S.T. (2009) Influences of carcass weight on histochemical characteristics and meat quality of crossbred (Korean native black pig X Landrace) pigs. In: *Proceedings of 55th International Congress of Meat Science and Technology*, Denmark: Copenhagen.
- Kim N.K., Cho S., Lee S.H., Park H.R., Lee C.S., Cho Y.M., Choy Y.H., Yoon D., Im S.K. & Park E.W. (2008) Proteins in longissimus muscle of Korean native cattle and their relationship to meat quality. *Meat Sci* **80**, 1068-73.
- Kim O., Chung S.S., Woo K.M., Ha D.B. & Chung C.H. (1992) Purification and partial characterization of a trypsin inhibitor from chick skeletal muscle. *Biochem Int* **27**, 963-72.
- Kinane J.A., Benakanakere M.R., Zhao J., Hosur K.B. & Kinane D.F. (2012) Porphyromonas gingivalis influences actin degradation within epithelial cells during invasion and apoptosis. *Cellular Microbiology* **14**, 1085-96.
- King D.A., Schuehle Pfeiffer C.E., Randel R.D., Welsh T.H., Jr., Oliphint R.A., Baird B.E., Curley K.O., Jr., Vann R.C., Hale D.S. & Savell J.W. (2006) Influence of animal temperament and stress responsiveness on the carcass quality and beef tenderness of feedlot cattle. *Meat Sci* **74**, 546-56.

- Kjaersgard I.V. & Jessen F. (2003) Proteome analysis elucidating post-mortem changes in cod (*Gadus morhua*) muscle proteins. *J Agric Food Chem* **51**, 3985-91.
- Kjaersgard I.V., Norrelykke M.R. & Jessen F. (2006) Changes in cod muscle proteins during frozen storage revealed by proteome analysis and multivariate data analysis. *Proteomics* **6**, 1606-18.
- Klont R.E., Brocks L. & Eikelenboom G. (1998) Muscle fibre type and meat quality. *Meat Sci* **49S1**, S219-29.
- Koohmaraie M. & Geesink G.H. (2006) Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Sci* **74**, 34-43.
- Koohmaraie M., Kent M.P., Shackelford S.D., Veiseth E. & Wheeler T.L. (2002) Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? *Meat Science* **62**, 345-52.
- Koohmaraie M., Whipple G., Kretchmar D.H., Crouse J.D. & Mersmann H.J. (1991) Postmortem proteolysis in longissimus muscle from beef, lamb and pork carcasses. *Journal of Animal Science* **69**, 617-24.
- Kothakota S., Azuma T., Reinhard C., Klippel A., Tang J., Chu K., McGarry T.J., Kirschner M.W., Koths K., Kwiatkowski D.J. & Williams L.T. (1997) Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* **278**, 294-8.
- Krell D., Assoku M., Galloway M., Mulholland P., Tomlinson I. & Bardella C. (2011) Screen for IDH1, IDH2, IDH3, D2HGDH and L2HGDH mutations in glioblastoma. *PLoS One* **6**, e19868.
- Krieser R.J. & White K. (2002) Engulfment mechanism of apoptotic cells. *Current Opinion in Cell Biology* **14**, 734-8.
- Krischek C., Natter R., Wigger R. & Wicke M. (2011) Adenine nucleotide concentrations and glycolytic enzyme activities in longissimus muscle samples of different pig genotypes collected before and after slaughter. *Meat Science* **89**, 217-20.
- Kroemer G. (2003) Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem Biophys Res Commun* **304**, 433-5.
- Kroemer G., Galluzzi L. & Brenner C. (2007) Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiological Reviews* **87**, 99-163.
- Kroemer G. & Reed J.C. (2000) Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* **6**, 513-9.
- Kruman I.I. & Mattson M.P. (1999) Pivotal Role of Mitochondrial Calcium Uptake in Neural Cell Apoptosis and Necrosis. *Journal of Neurochemistry* **72**, 529-40.
- Kuehn L., Dahlmann B. & Reinauer H. (1984) Identification of four distinct serine proteinase inhibitors in rat skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* **120**, 96-102.
- Kultz D. (2003) Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function. *J Exp Biol* **206**, 3119-24.
- Kwasiborski A., Sayd T., Chambon C., Sante-Lhoutellier V., Rocha D. & Terlouw C. (2008a) Pig Longissimus lumborum proteome: Part I. Effects of genetic background, rearing environment and gender. *Meat Sci* **80**, 968-81.
- Kwasiborski A., Sayd T., Chambon C., Sante-Lhoutellier V., Rocha D. & Terlouw C. (2008b) Pig Longissimus lumborum proteome: Part II: Relationships between protein content and meat quality. *Meat Sci* **80**, 982-96.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.

- Lametsch R., Karlsson A., Rosenfold K., Andersen H.J., Roepstorff P. & Bendixen E. (2003) Postmortem proteome changes of porcine muscle related to tenderness. *J Agric Food Chem* **51**, 6992-7.
- Lametsch R., Kristensen L., Larsen M.R., Therkildsen M., Oksbjerg N. & Ertbjerg P. (2006) Changes in the muscle proteome after compensatory growth in pigs. *Journal of Animal Science* **84**, 918-24.
- Lametsch R., Roepstorff P. & Bendixen E. (2002) Identification of Protein Degradation during Post-mortem Storage of Pig Meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 5508-12.
- Lang P.A., Kempe D.S., Tanneur V., Eisele K., Klarl B.A., Myssina S., Jendrossek V., Ishii S., Shimizu T., Waidmann M., Hessler G., Huber S.M., Lang F. & Wieder T. (2005) Stimulation of erythrocyte ceramide formation by platelet-activating factor. *J Cell Sci* **118**, 1233-43.
- Lanneau D., Brunet M., Frisan E., Solary E., Fontenay M. & Garrido C. (2008) Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J Cell Mol Med* **12**, 743-61.
- Larzul C., Lefaucheur L., Ecolan P., Gogue J., Talmant A., Sellier P., Le Roy P. & Monin G. (1997) Phenotypic and genetic parameters for longissimus muscle fiber characteristics in relation to growth, carcass, and meat quality traits in large white pigs. *J Anim Sci* **75**, 3126-37.
- Laville E., Sayd T., Morzel M., Blinet S., Chambon C., Lepetit J., Renand G. & Hocquette J.F.o. (2009a) Proteome Changes during Meat Aging in Tough and Tender Beef Suggest the Importance of Apoptosis and Protein Solubility for Beef Aging and Tenderization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 10755-64.
- Laville E., Sayd T., Terlouw C., Blinet S., Pinguet J., Fillaut M., Glénisson J. & Chérel P. (2009b) Differences in Pig Muscle Proteome According to HAL Genotype: Implications for Meat Quality Defects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 4913-23.
- Lawrence D.A., Olson S.T., Muhammad S., Day D.E., Kvassman J.O., Ginsburg D. & Shore J.D. (2000) Partitioning of serpin-proteinase reactions between stable inhibition and substrate cleavage is regulated by the rate of serpin reactive center loop insertion into beta-sheet A. *J Biol Chem* **275**, 5839-44.
- Lawrie R.A. & Ledward D.A. (2006) Chapter 4 - Chemical and biochemical constitution of muscle. In: *Lawrie's Meat Science (Seventh Edition)* (ed. by Ledward RALA), pp. 75-127. Woodhead Publishing.
- Lebart L. (1995) Morineau. *Pirón M. Statistique exploratoire multidimensionnelle*. Paris: Dunod.
- Lebret B., Denieul K. & Damon M. (2013) Muscle transcriptome profiles highlight biomarkers of pig production system and high meat quality. In: *59th International Congress of Meat Science and Technology (ICOMST). 2013-08-182013-08-23, Izmir, Turquie*. International Congress of Meat Science and Technology.
- Lebret B. & Picard B. (2015) Les principales composantes de la qualité des carcasses et des viandes dans les différentes espèces animales. *INRA Productions Animales* **28**, 93-8.
- Lee C., Park S.H., Lee M.Y. & Yu M.H. (2000) Regulation of protein function by native metastability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7727-31.
- Leeuwenburgh C. (2003) Role of apoptosis in sarcopenia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **58**, 999-1001.
- Lefaucheur L. (2001) Myofiber typing and pig meat production. *Slovenski veterinarski zbornik (Slovenia)*.
- Lefaucheur L. (2010) A second look into fibre typing--relation to meat quality. *Meat Sci* **84**, 257-70.
- Lepetit J. & Culioli J. (1994) Mechanical properties of meat. *Meat Science* **36**, 203-37.
- Levine B. & Yuan J. (2005) Autophagy in cell death: an innocent convict? *The Journal of Clinical Investigation* **115**, 2679-88.

- Li C.B., Zhou G.H. & Xu X.L. (2010) Dynamical Changes of Beef Intramuscular Connective Tissue and Muscle Fiber during Heating and their Effects on Beef Shear Force. *Food and Bioprocess Technology* **3**, 521-7.
- Li P., Nijhawan D. & Wang X. (2004) Mitochondrial activation of apoptosis. *Cell* **116**, S57-9, 2 p following S9.
- Li Y.-b., Bao E.-d., Wang Z.-l. & Zhao R.-q. (2007) Detection of HSP mRNA Transcription in Transport Stressed Pigs by Fluorescence Quantitative RT-PCR. *Agricultural Sciences in China* **6**, 361-7.
- Lim H., Eng J., Yates Iii J.R., Tollaksen S.L., Giometti C.S., Holden J.F., Adams M.W.W., Reich C.I., Olsen G.J. & Hays L.G. (2003) Identification of 2D-gel proteins: A comparison of MALDI/TOF peptide mass mapping to μ LC-ESI tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **14**, 957-70.
- Lindahl G., Henckel P., Karlsson A.H. & Andersen H.J. (2006) Significance of early postmortem temperature and pH decline on colour characteristics of pork loin from different crossbreeds. *Meat Sci* **72**, 613-23.
- Ling X.-P., Zhu J.-Y., Huang L. & Huang H.-Q. (2009) Proteomic changes in response to acute cadmium toxicity in gill tissue of *Paralichthys olivaceus*. *Environ Toxicol Pharmacol* **27**, 212-8.
- Lippolis J.D. & Reinhardt T.A. (2008) CENTENNIAL PAPER: Proteomics in animal science. *Journal of Animal Science* **86**, 2430-41.
- Listrat A. & Hocquette J.F. (2004) Analytical limits of total and insoluble collagen content measurements and of type I and III collagen analysis by electrophoresis in bovine muscles. *Meat Sci* **68**, 127-36.
- Listrat A., Lebret B., Louveau I., Astruc T., Bonnet M., Lefaucheur L. & Bugeon J. (2015) Comment la structure et la composition du muscle déterminent la qualité des viandes ou chairs. *INRA Productions Animales* **28**, 125-36.
- Listrat A., Picard B. & Geay Y. (1998) Age-related changes and location of type I, III and IV collagens during skeletal muscle development of double-muscléd and normal bovine fetuses. *J Muscle Res Cell Motil* **19**, 1-14.
- Listrat A., Picard B., Jailler R., Collignon H., Peccatte J.-R., Micol D., Geay Y. & Dozias D. (2001) Grass valorisation and muscular characteristics of blonde d'Aquitaine steers. *Anim. Res.* **50**, 105-18.
- Listrat A., Rakadjiyski N., Jurie C., Picard B., Touraille C. & Geay Y. (1999) Effect of the type of diet on muscle characteristics and meat palatability of growing Salers bulls. *Meat Sci* **53**, 115-24.
- Liu C.C. & Ahearn J.M. (2001) Apoptosis of skeletal muscle cells and the pathogenesis of myositis: a perspective. *Curr Rheumatol Rep* **3**, 325-33.
- Liu Q., Lanari M.C. & Schaefer D.M. (1995) A review of dietary vitamin E supplementation for improvement of beef quality. *J Anim Sci* **73**, 3131-40.
- Liu W., Porter N.A., Schneider C., Brash A.R. & Yin H. (2011) Formation of 4-hydroxynonenal from cardiolipin oxidation: Intramolecular peroxy radical addition and decomposition. *Free Radical Biology and Medicine* **50**, 166-78.
- Liu X.D., Jayasena D.D., Jung Y., Jung S., Kang B.S., Heo K.N., Lee J.H. & Jo C. (2012) Differential Proteome Analysis of Breast and Thigh Muscles between Korean Native Chickens and Commercial Broilers. *Asian Australas. J. Anim. Sci* **25**, 895-902.
- Lomiwes D., Farouk M.M., Frost D.A., Dobbie P.M. & Young O.A. (2013) Small heat shock proteins and toughness in intermediate pHu beef. *Meat Sci* **95**, 472-9.
- Lomiwes D., Farouk M.M., Wiklund E. & Young O.A. (2014a) Small heat shock proteins and their role in meat tenderness: a review. *Meat Sci* **96**, 26-40.

- Lomiwes D., Hurst S.M., Dobbie P., Frost D.A., Hurst R.D., Young O.A. & Farouk M.M. (2014b) The protection of bovine skeletal myofibrils from proteolytic damage post mortem by small heat shock proteins. *Meat Sci* **97**, 548-57.
- Longo V., Lana A., Bottero M.T. & Zolla L. (2015) Apoptosis in muscle-to-meat aging process: The omic witness. *J Proteomics* **125**, 29-40.
- Lorenzen C.L., Davuluri V.K., Adhikari K. & Grün I.U. (2005) Effect of End-point Temperature and Degree of Doneness on Sensory and Instrumental Flavor Profile of Beefsteaks. *Journal of Food Science* **70**, S113-S8.
- Lorenzen C.L., Miller R.K., Taylor J.F., Neely T.R., Tatum J.D., Wise J.W., Buyck M.J., Reagan J.O. & Savell J.W. (2003) Beef Customer Satisfaction: Trained sensory panel ratings and Warner-Bratzler shear force values1. *J Anim Sci* **81**, 143-9.
- Lourenço dos Santos S., Baraibar M.A., Lundberg S., Eeg-Olofsson O., Larsson L. & Friguet B. (2015) Oxidative proteome alterations during skeletal muscle ageing. *Redox Biology* **5**, 267-74.
- Luccia A.D., Picariello G., Cacace G., Scaloni A., Faccia M., Liuzzi V., Alviti G. & Musso S.S. (2005) Proteomic analysis of water soluble and myofibrillar protein changes occurring in dry-cured hams. *Meat Science* **69**, 479-91.
- Luning P.A. & Marcelis W.J. (2006) A techno-managerial approach in food quality management research. *Trends in Food Science & Technology* **17**, 378-85.
- Mach N., Keuning E., Kruijt L., Hortos M., Arnau J. & Te Pas M.F. (2010) Comparative proteomic profiling of 2 muscles from 5 different pure pig breeds using surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight proteomics technology. *J Anim Sci* **88**, 1522-34.
- Maher S.C., Mullen A.M., Moloney A.P., Buckley D.J. & Kerry J.P. (2004) Quantifying the extent of variation in the eating quality traits of the M. longissimus dorsi and M. semimembranosus of conventionally processed Irish beef. *Meat Sci* **66**, 351-60.
- Majno G. & Joris I. (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* **146**, 3-15.
- Malli R. & Graier W.F. (2010) Mitochondrial Ca²⁺ channels: Great unknowns with important functions. *FEBS Lett* **584**, 1942-7.
- Malmstrom J., Lee H. & Aebersold R. (2007) Advances in proteomic workflows for systems biology. *Curr Opin Biotechnol* **18**, 378-84.
- Malmström J., Lee H. & Aebersold R. (2007) Advances in proteomic workflows for systems biology. *Curr Opin Biotechnol* **18**, 378-84.
- Maltin C.A., Balcerzak D., Tilley R. & Delday M. (2003) Determinants of meat quality: tenderness. *Proc Nutr Soc* **62**, 337-47.
- Mancini R.A. (2009) 4 - Meat color. In: *Improving the sensory and nutritional quality of fresh meat* (eds. by Kerry JP & Ledward D), pp. 89-110. Woodhead Publishing.
- Mancini R.A. & Hunt M.C. (2005) Current research in meat color. *Meat Sci* **71**, 100-21.
- Mandell I.B., Gullett E.A., Wilton J.W., Kemp R.A. & Allen O.B. (1997) Effects of gender and breed on carcass traits, chemical composition, and palatability attributes in Hereford and Simmental bulls and steers. *Livestock Production Science* **49**, 235-48.
- Manevich Y. & Fisher A.B. (2005) Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospholipid metabolism. *Free Radic Biol Med* **38**, 1422-32.

- Marcos B., Gou P., Guardia M.D., Hortos M., Colleo M., Mach N., Te Pas M.F., Keuning E., Kruijt L., Tibau J., Gispert M. & Arnau J. (2013a) Surface-enhanced laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry: a tool to predict pork quality. *Meat Sci* **95**, 688-93.
- Marcos B., Gou P., Serra X., Guardia M.D., Zhen Z.Y., Hortos M., Mach N., te Pas M.F., Keuning E., Kruijt L., Font i Furnols M. & Arnau J. (2013b) Analysis of raw hams using SELDI-TOF-MS to predict the final quality of dry-cured hams. *Meat Sci* **93**, 233-9.
- Marcos B., Kerry J.P. & Mullen A.M. (2010) High pressure induced changes on sarcoplasmic protein fraction and quality indicators. *Meat Sci* **85**, 115-20.
- Marcos B. & Mullen A.M. (2013) High pressure induced changes in beef muscle proteome: Correlation with quality parameters. *Meat Sci* **97**, 11-20.
- Marcos B. & Mullen A.M. (2014) High pressure induced changes in beef muscle proteome: Correlation with quality parameters. *Meat Science* **97**, 11-20.
- Marouga R., David S. & Hawkins E. (2005) The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem* **382**, 669-78.
- Marques C., Guo W., Pereira P., Taylor A., Patterson C., Evans P.C. & Shang F. (2006) The triage of damaged proteins: degradation by the ubiquitin-proteasome pathway or repair by molecular chaperones. *Faseb J* **20**, 741-3.
- Martens H., Stabursvik E. & Martens M. (1982) Texture and Colour Changes in Meat during Cooking Related to Thermal Denaturation of Muscle Proteins. *Journal of Texture Studies* **13**, 291-309.
- Martin S.J., Reutelingsperger C.P., McGahon A.J., Rader J.A., van Schie R.C., LaFace D.M. & Green D.R. (1995a) Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* **182**, 1545-56.
- Martin S.J., Reutelingsperger C.P., McGahon A.J., Rader J.A., van Schie R.C., LaFace D.M. & Green D.R. (1995b) Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* **182**, 1545-56.
- Maruyama W., Irie S. & Sato T.A. (2000) Morphological changes in the nucleus and actin cytoskeleton in the process of Fas-induced apoptosis in Jurkat T cells. *Histochem J* **32**, 495-503.
- Mashima T., Naito M., Fujita N., Noguchi K. & Tsuruo T. (1995) Identification of actin as a substrate of ICE and an ICE-like protease and involvement of an ICE-like protease but not ICE in VP-16-induced U937 apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **217**, 1185-92.
- Mashima T., Naito M., Noguchi K., Miller D.K., Nicholson D.W. & Tsuruo T. (1997) Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis. *Oncogene* **14**, 1007-12.
- Mashima T., Naito M. & Tsuruo T. (1999) Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal actin plays a positive role in the process of morphological apoptosis. *Oncogene* **18**, 2423-30.
- Matsura T., Togawa A., Kai M., Nishida T., Nakada J., Ishibe Y., Kojo S., Yamamoto Y. & Yamada K. (2005) The presence of oxidized phosphatidylserine on Fas-mediated apoptotic cell surface. *Biochim Biophys Acta* **1736**, 181-8.
- Mattson M.P. & Chan S.L. (2003) Calcium orchestrates apoptosis. *Nat Cell Biol* **5**, 1041-3.
- Mayer M.P. (2013) Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. *Trends Biochem Sci* **38**, 507-14.

- McConnell E.J. & Raess B.U. (2002) Intracellular Ca²⁺ Homeostatic Regulation and 4-Hydroxynonenal-Induced Aortic Endothelial Dysfunction. *Endothelium* **9**, 45-53.
- McCormick R. (2009) Collagen. *Applied Muscle Biology and Meat Science*. M. Du and RJ McCormick, ed. CRC Press, New York, NY, 129-48.
- McNamee R. (2005) Regression modelling and other methods to control confounding. *Occupational and Environmental Medicine* **62**, 500-6.
- Meunier B., Picard B., Astruc T. & Labas R. (2010) Development of image analysis tool for the classification of muscle fibre type using immunohistochemical staining. *Histochemistry and Cell Biology* **134**, 307-17.
- Micol D., Jurie C. & Hocquette J. (2010) Qualités sensorielles de la viande bovine. Impacts des facteurs d'élevage. *Muscle et viande de ruminant*. Quae éditions. Versailles, France, 163-73.
- Miller M.F., Carr M.A., Ramsey C.B., Crockett K.L. & Hoover L.C. (2001) Consumer thresholds for establishing the value of beef tenderness. *J Anim Sci* **79**, 3062-8.
- Miller M.F., Cross H.R., Crouse J.D. & Jenkins T.G. (1987) Effect of feed energy intake on collagen characteristics and muscle quality of mature cows. *Meat Science* **21**, 287-94.
- Mitsumoto A., Nakagawa Y., Takeuchi A., Okawa K., Iwamatsu A. & Takanezawa Y. (2001) Oxidized forms of peroxiredoxins and DJ-1 on two-dimensional gels increased in response to sublethal levels of paraquat. *Free Radical Research* **35**, 301-10.
- Mohanty B., Mitra T., Banerjee S., Bhattacharjee S., Mahanty A., Ganguly S., Purohit G., Karunakaran D. & Mohanty S. (2015) Proteomic profiling of white muscle from freshwater catfish Rita rita. *Fish Physiol Biochem* **41**, 789-802.
- Mohanty B.P., Banerjee S., Bhattacharjee S., Mitra T. & Purohit G.K. (2013) Muscle proteomics of the Indian major carp catla (Catla catla, Hamilton). *J Proteomics Bioinform* **6**, 252-63.
- Monin G. (1988) Stress d'abattage et qualités de la viande. *Rec. Med. Vet* **164**, 835-42.
- Monin G. (1991) Facteurs biologiques des qualités de la viande bovine. *INRA Productions Animales* **4**, 151-60.
- Monin G. & Laborde D. (1985) Water holding capacity of pig muscle proteins: Interaction between the myofibrillar proteins and sarcoplasmic compounds. *Sciences des Aliments (France)*.
- Monson F., Sanudo C. & Sierra I. (2005) Influence of breed and ageing time on the sensory meat quality and consumer acceptability in intensively reared beef. *Meat Sci* **71**, 471-9.
- Montgomery J.L., Parrish F.C., Beitz D.C., Horst R.L., Huff-Lonergan E.J. & Trenkle A.H. (2000) The use of vitamin D3 to improve beef tenderness. *Journal of Animal Science* **78**, 2615-21.
- Montowska M., Alexander M.R., Tucker G.A. & Barrett D.A. (2014a) Rapid detection of peptide markers for authentication purposes in raw and cooked meat using ambient liquid extraction surface analysis mass spectrometry. *Anal Chem* **86**, 10257-65.
- Montowska M., Rao W., Alexander M.R., Tucker G.A. & Barrett D.A. (2014b) Tryptic digestion coupled with ambient desorption electrospray ionization and liquid extraction surface analysis mass spectrometry enabling identification of skeletal muscle proteins in mixtures and distinguishing between beef, pork, horse, chicken, and turkey meat. *Anal Chem* **86**, 4479-87.
- Morgan J.B., Savell J.W., Hale D.S., Miller R.K., Griffin D.B., Cross H.R. & Shackelford S.D. (1991) National beef tenderness survey. *J Anim Sci* **69**, 3274-83.
- Morris C.A., Cullen N.G., Hickey S.M., Dobbie P.M., Veenvliet B.A., Manley T.R., Pitchford W.S., Kruk Z.A., Bottema C.D.K. & Wilson T. (2006) Genotypic effects of calpain 1 and calpastatin on the tenderness of

- cooked M. longissimus dorsi steaks from Jersey × Limousin, Angus and Hereford-cross cattle. *Animal Genetics* **37**, 411-4.
- Mortensen L.M., Frøst M.B., Skibsted L.H. & Risbo J. (2012) Effect of Time and Temperature on Sensory Properties in Low-Temperature Long-Time Sous-Vide Cooking of Beef. *Journal of Culinary Science & Technology* **10**, 75-90.
- Morzel M., Chambon C., Hamelin M., Sante-Lhoutellier V., Sayd T. & Monin G. (2004) Proteome changes during pork meat ageing following use of two different pre-slaughter handling procedures. *Meat Sci* **67**, 689-96.
- Morzel M., Terlouw C., Chambon C., Micol D. & Picard B. (2008) Muscle proteome and meat eating qualities of Longissimus thoracis of "Blonde d'Aquitaine" young bulls: A central role of HSP27 isoforms. *Meat Science* **78**, 297-304.
- Mottram D.S. (1998) Flavour formation in meat and meat products: a review. *Food Chemistry* **62**, 415-24.
- Mullen A.M., Pannier L. & Hamill R. (2009) 9 - New insights into the biology of meat quality from genomic and proteomic perspectives, with particular emphasis on beef. In: *Improving the sensory and nutritional quality of fresh meat* (eds. by Kerry JP & Ledward D), pp. 199-224. Woodhead Publishing.
- Murlasits Z., Cutlip R.G., Geronilla K.B., Rao K.M., Wonderlin W.F. & Alway S.E. (2006) Resistance training increases heat shock protein levels in skeletal muscle of young and old rats. *Exp Gerontol* **41**, 398-406.
- Muroya S., Ohnishi-Kameyama M., Oe M., Nakajima I., Shibata M. & Chikuni K. (2007) Double phosphorylation of the myosin regulatory light chain during rigor mortis of bovine Longissimus muscle. *J Agric Food Chem* **55**, 3998-4004.
- Nagakubo D., Taira T., Kitaura H., Ikeda M., Tamai K., Iguchi-Ariga S.M.M. & Ariga H. (1997) DJ-1, a Novel Oncogene Which Transforms Mouse NIH3T3 Cells in Cooperation withras. *Biochem Biophys Res Commun* **231**, 509-13.
- Nakanishi K., Maruyama M., Shibata T. & Morishima N. (2001) Identification of a Caspase-9 Substrate and Detection of Its Cleavage in Programmed Cell Death during Mouse Development. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 41237-44.
- Nath R., Raser K.J., McGinnis K., Nadimpalli R., Stafford D. & Wang K.K. (1996) Effects of ICE-like protease and calpain inhibitors on neuronal apoptosis. *Neuroreport* **8**, 249-55.
- Naylor S. (2003) Biomarkers: current perspectives and future prospects. *Expert Rev Mol Diagn* **3**, 525-9.
- Neuhoff V., Arold N., Taube D. & Ehrhardt W. (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255-62.
- Nicotera P. & Orrenius S. (1998) The role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium* **23**, 173-80.
- Nilsson T., Mann M., Aebersold R., Yates J.R., Bairoch A. & Bergeron J.J.M. (2010) Mass spectrometry in high-throughput proteomics: ready for the big time. *Nat Meth* **7**, 681-5.
- Nishimura T. (2010) The role of intramuscular connective tissue in meat texture. *Anim Sci J* **81**, 21-7.
- Nishimura T. (2015) Role of extracellular matrix in development of skeletal muscle and postmortem aging of meat. *Meat Science* **109**, 48-55.
- Nishimura T., Ojima K., Liu A., Hattori A. & Takahashi K. (1996) Structural changes in the intramuscular connective tissue during development of bovine semitendinosus muscle. *Tissue Cell* **28**, 527-36.

- Noguchi T. & Kandatsu M. (1969) Inhibition of autolytic breakdown of muscle proteins by the sarcoplasm and the serum of rat. *Agricultural and Biological Chemistry* **33**, 1226-8.
- O'Brien M.A. & Kirby R. (2008) Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* **18**, 572-85.
- O'Brien P.J., Siraki A.G. & Shangari N. (2005) Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health. *Crit Rev Toxicol* **35**, 609-62.
- O'Farrell P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry* **250**, 4007-21.
- Obuz E. & Dikeman M.E. (2003) Effects of cooking beef muscles from frozen or thawed states on cooking traits and palatability. *Meat Science* **65**, 993-7.
- Offer G. (1991) Modelling of the formation of pale, soft and exudative meat: Effects of chilling regime and rate and extent of glycolysis. *Meat Sci* **30**, 157-84.
- Offer G., Knight P., Jeacocke R., Almond R., Cousins T., Elsey J., Parsons N., Sharp A., Starr R. & Purslow P. (1989) The structural basis of the water-holding, appearance and toughness of meat and meat products. *Food microstructure (USA)*.
- Oliver M.A., Nute G.R., Font I.F.M., San Julian R., Campo M.M., Sanudo C., Caneque V., Guerrero L., Alvarez I., Diaz M.T., Branscheid W., Wicke M. & Montossi F. (2006) Eating quality of beef, from different production systems, assessed by German, Spanish and British consumers. *Meat Sci* **74**, 435-42.
- Olleta J., Sanudo C., Monson F., Campo M., Panea B., Alberti P., Christensen M., Ertbjerg P., Failla S. & Gigli S. (2006) Sensory evaluation of several European cattle breeds.
- Olson S.T. & Gettins P.G. (2011) Regulation of proteases by protein inhibitors of the serpin superfamily. *Prog Mol Biol Transl Sci* **99**, 185-240.
- Orrenius S., Gogvadze V. & Zhivotovsky B. (2015) Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. *Biochem Biophys Res Commun* **460**, 72-81.
- Orrenius S., Zhivotovsky B. & Nicotera P. (2003) Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 552-65.
- Ouali A. (1990) Meat Tenderization: Possible Causes and Mechanisms. A Review. *Journal of Muscle Foods* **1**, 129-65.
- Ouali A. (1991) Sensory quality of meat as affected by muscle biochemistry and modern technologies. *Developments in Animal and Veterinary Sciences (Netherlands)*.
- Ouali A. (1992) Proteolytic and physicochemical mechanisms involved in meat texture development. *Biochimie* **74**, 251-65.
- Ouali A., Gagaoua M., Boudida Y., Becila S., Boudjellal A., Herrera-Mendez C.H. & Sentandreu M.A. (2013) Biomarkers of meat tenderness: present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanisms involved. *Meat Sci* **95**, 854-70.
- Ouali A., Herrera-Mendez C.H., Coulis G., Becila S., Boudjellal A., Aubry L. & Sentandreu M.A. (2006) Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Sci* **74**, 44-58.
- Ouali A., Herrera-Mendez C.H., Coulis G., Samira B., Boudjellal A., Harhoura K., Aubry L. & Sentandreu M.A. (2007) Meat tenderisation and muscle cell death, two highly related events. *Tehnologija Mesa* **48**, 1-15.
- Ouali A., Rouchon P., Zabari M., Berri M., Zamora F. & Tassy C. (1995) Natural serine and cysteine proteinase inhibitors in bovine skeletal muscle. In *Expression of tissue proteinases and regulation of protein*

- degradation as related to meat quality* Edited by: Ouali A, Demeyer D, Smulders FJM. Utrecht (NL): ECCEAMST,, 173 - 98.
- Ouali A. & Talmant A. (1990) Calpains and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal muscles. *Meat Sci* **28**, 331-48.
- Oury M.P., Agabriel J., Agabriel C., Micol D., Picard B., Blanquet J., Labouré H., Roux M. & Dumont R. (2007) Relationship between rearing practices and eating quality traits of the muscle rectus abdominis of Charolais heifers. *Livestock Science* **111**, 242-54.
- Owens C.M., Alvarado C. & Sams A.R. (2000) *Poultry Meat Processing*. CRC Press.
- Pak C.W., Flynn K.C. & Bamberg J.R. (2008) Actin-binding proteins take the reins in growth cones. *Nat Rev Neurosci* **9**, 136-47.
- Pak S.C., Tsu C., Luke C.J., Askew Y.S. & Silverman G.A. (2006) The Caenorhabditis elegans muscle specific serpin, SRP-3, neutralizes chymotrypsin-like serine peptidases. *Biochemistry* **45**, 4474-80.
- Pappa A., Brown D., Koutalos Y., DeGregori J., White C. & Vasiliou V. (2005) Human aldehyde dehydrogenase 3A1 inhibits proliferation and promotes survival of human corneal epithelial cells. *J Biol Chem* **280**, 27998-8006.
- Pappin D.J.C., Hojrup P. & Bleasby A.J. (1993) Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Current Biology* **3**, 327-32.
- Paredi G., Sentandreu M.A., Mozzarelli A., Fadda S., Hollung K. & de Almeida A.M. (2013) Muscle and meat: new horizons and applications for proteomics on a farm to fork perspective. *J Proteomics* **88**, 58-82.
- Parola M., Robino G., Marra F., Pinzani M., Bellomo G., Leonarduzzi G., Chiarugi P., Camandola S., Poli G., Waeg G., Gentilini P. & Dianzani M.U. (1998) HNE interacts directly with JNK isoforms in human hepatic stellate cells. *The Journal of Clinical Investigation* **102**, 1942-50.
- Pearce M.C., Pike R.N., Lesk A.M. & Bottomley S.P. (2007) Serpin conformations. *Molecular and Cellular Aspects of the Serpinopathies and Disorders in Serpin Activity*. World Scientific, 35-66.
- Pearson A.M. (2012) *Muscle and meat biochemistry*. Elsevier.
- Pedersen S.K., Harry J.L., Sebastian L., Baker J., Traini M.D., McCarthy J.T., Manoharan A., Wilkins M.R., Gooley A.A., Righetti P.G., Packer N.H., Williams K.L. & Herbert B.R. (2003) Unseen Proteome: Mining Below the Tip of the Iceberg To Find Low Abundance and Membrane Proteins. *Journal of Proteome Research* **2**, 303-11.
- Pejler G., Abrink M., Ringvall M. & Wernersson S. (2007) Mast cell proteases. *Adv Immunol* **95**, 167-255.
- Pelissier P., Delourme D., Germot A., Blanchet X., Becila S., Maftah A., Leveziel H., Ouali A. & Bremaud L. (2008) An original SERPINA3 gene cluster: elucidation of genomic organization and gene expression in the Bos taurus 21q24 region. *BMC Genomics* **9**, 151.
- Penzo D., Petronilli V., Angelin A., Cusan C., Colonna R., Scorrano L., Pagano F., Prato M., Di Lisa F. & Bernardi P. (2004) Arachidonic Acid Released by Phospholipase A2 Activation Triggers Ca²⁺-dependent Apoptosis through the Mitochondrial Pathway. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 25219-25.
- Péré-Brissaud A., Blanchet X., Delourme D., Pélissier P., Forestier L., Delavaud A., Duprat N., Picard B., Maftah A. & Brémaud L. (2015) Expression of SERPINA3s in cattle: focus on bovSERPINA3-7 reveals specific involvement in skeletal muscle. *Open Biology* **5**, 150071.

- Perry J.J.P., Shin D.S., Getzoff E.D. & Tainer J.A. (2010) The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1804**, 245-62.
- Phongpa-Ngan P., Grider A., Mulligan J.H., Aggrey S.E. & Wicker L. (2011) Proteomic Analysis and Differential Expression in Protein Extracted from Chicken with a Varying Growth Rate and Water-Holding Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 13181-7.
- Picard B., Barboiron C., Chadeyron D. & Jurie C. (2011a) Protocol for high-resolution electrophoresis separation of myosin heavy chain isoforms in bovine skeletal muscle. *Electrophoresis* **32**, 1804-6.
- Picard B., Barboiron C., Duris M.P., Gagniere H., Jurie C. & Geay Y. (1999) Electrophoretic separation of bovine muscle myosin heavy chain isoforms. *Meat Sci* **53**, 1-7.
- Picard B., Berri C., Lefaucheur L., Molette C., Sayd T. & Terlouw C. (2010) Skeletal muscle proteomics in livestock production. *Brief Funct Genomics* **9**, 259-78.
- Picard B. & Cassar-Malek I. (2009) Evidence for expression of IIb myosin heavy chain isoform in some skeletal muscles of Blonde d'Aquitaine bulls. *Meat Sci* **82**, 30-6.
- Picard B., Cassar-Malek I., Guillemain N. & Bonnet M. (2011b) 4.32 - Quest for Novel Muscle Pathway Biomarkers by Proteomics in Beef Production. In: *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)* (ed. by Moo-Young M), pp. 395-405. Academic Press, Burlington.
- Picard B., Gagaoua M., Kammoun M., Terlouw C., Hocquette J.F. & Micol D. (2013) Biomarkers of beef tenderness in young bulls of three breeds. In: *Proceedings of the 59th International Congress of Meat Science and Technology*, p. 4, Izmir, Turkey.
- Picard B., Gagaoua M., Micol D., Cassar-Malek I., Hocquette J.F. & Terlouw C.E. (2014) Inverse relationships between biomarkers and beef tenderness according to contractile and metabolic properties of the muscle. *J Agric Food Chem* **62**, 9808-18.
- Picard B., Gagniere H., Robelin J., Pons F. & Geay Y. (1995) Presence of an unidentified myosin isoform in certain bovine foetal muscles. *Meat Sci* **41**, 315-24.
- Picard B., Jurie C., Bauchart D., Dransfield E., Ouali A., Martin J.F., Jailler R., Lepetit J. & Culiolo J. (2007) Caractéristiques des muscles et de la viande des principales races bovines allaitantes du Massif Central. *Sciences des Aliments* **27/2**, 168-80.
- Picard B., Lebret B., Cassar-Malek I., Liaubet L., Berri C., Le Bihan-Duval E., Hocquette J.F. & Renand G. (2015a) Recent advances in omic technologies for meat quality management. *Meat Science* **109**, 18-26.
- Picard B., Lebret B., Cassar-Malek I., Liaubet L., Berri C., Le Bihan-Duval E., Lefevre F., Hocquette J. & Renand G. (2015b) Des marqueurs génomiques au service de la qualité de la viande. *INRA Productions Animales* **28**, 183-96.
- Picard B., Lefevre F. & Lebret B. (2012a) Meat and fish flesh quality improvement with proteomic applications. *Animal Frontiers* **2**, 18-25.
- Picard B., Leger J. & Robelin J. (1994) Quantitative determination of type I myosin heavy chain in bovine muscle with anti myosin monoclonal antibodies. *Meat Sci* **36**, 333-43.
- Picard B., Meunier B., Barboiron C., Dunoyer N., Guillemain N. & Micol D. (2012b) From protein markers to phenotyping tools for evaluation of beef tenderness. In: *Farm animal proteomics* (eds. by Rodrigues P, Eckersall D & Almeida A), pp. 165-8. Wageningen Academic Publishers.

- Pierzchala M., Hoekman A.J., Urbanski P., Kruijt L., Kristensen L., Young J.F., Oksbjerg N., Goluch D. & te Pas M.F. (2014) Validation of biomarkers for loin meat quality (M. longissimus) of pigs. *J Anim Breed Genet* **131**, 258-70.
- Piñeiro C., Barros-Velázquez J., Vázquez & Figueras A. (2003) Proteomics as a Tool for the Investigation of Seafood and Other Marine Products. *Journal of Proteome Research* **2**, 127-35.
- Pivovarova A.V., Mikhailova V.V., Chernik I.S., Chebotareva N.A., Levitsky D.I. & Gusev N.B. (2005) Effects of small heat shock proteins on the thermal denaturation and aggregation of F-actin. *Biochem Biophys Res Commun* **331**, 1548-53.
- Platter W.J., Tatum J.D., Belk K.E., Koontz S.R., Chapman P.L. & Smith G.C. (2005) Effects of marbling and shear force on consumers' willingness to pay for beef strip loin steaks. *J Anim Sci* **83**, 890-9.
- Poirier J., Dumas J.-L.R., Catala M. & André J.-M. (1999) *Histologie moléculaire: texte et atlas*. Masson.
- Polati R., Menini M., Robotti E., Million R., Marengo E., Novelli E., Balzan S. & Cecconi D. (2012) Proteomic changes involved in tenderization of bovine Longissimus dorsi muscle during prolonged ageing. *Food Chemistry* **135**, 2052-69.
- Porn-Ares M.I., Samali A. & Orrenius S. (1998) Cleavage of the calpain inhibitor, calpastatin, during apoptosis. *Cell Death Differ* **5**, 1028-33.
- Potempa J., Korzus E. & Travis J. (1994) The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* **269**, 15957-60.
- Praillet C., Grimaud J.-A. & Lortat-Jacob H. (1998) Les protéoglycanes.(I) Molécules aux multiples fonctions... futures molécules thérapeutiques?
- Primeau A.J., Adhihetty P.J. & Hood D.A. (2002) Apoptosis in Heart and Skeletal Muscle. *Canadian Journal of Applied Physiology* **27**, 349-95.
- Promeprat A., Sayd T., Laville E., Chambon C., Lebreton B. & Gatellier P. (2011) Early post-mortem sarcoplasmic proteome of porcine muscle related to protein oxidation. *Food Chemistry* **127**, 1097-104.
- Pulford D.J., Dobbie P., Fraga Vazquez S., Fraser-Smith E., Frost D.A. & Morris C.A. (2009) Variation in bull beef quality due to ultimate muscle pH is correlated to endopeptidase and small heat shock protein levels. *Meat Sci* **83**, 1-9.
- Pulford D.J., Fraga Vazquez S., Frost D.F., Fraser-Smith E., Dobbie P. & Rosenvold K. (2008a) The intracellular distribution of small heat shock proteins in post-mortem beef is determined by ultimate pH. *Meat Sci* **79**, 623-30.
- Pulford D.J., Frost D.F., Lomiwes D.D. & Farouk M.M. (2008b) Preliminary studies to determine the chaperoning properties of bovine casein and crystallin proteins at reducing beef muscle protein aggregation during heating. *International Journal of Food Science & Technology* **43**, 2143-50.
- Purchas R.W. & Aungsupakorn R. (1993) Further investigations into the relationship between ultimate pH and tenderness for beef samples from bulls and steers. *Meat Science* **34**, 163-78.
- Quillet-Mary A., Jaffrezou J.P., Mansat V., Bordier C., Naval J. & Laurent G. (1997) Implication of mitochondrial hydrogen peroxide generation in ceramide-induced apoptosis. *J Biol Chem* **272**, 21388-95.
- Rabilloud T. (1999) Silver Staining of 2-D Electrophoresis Gels. In: *2-D Proteome Analysis Protocols* (ed. by Link A), pp. 297-305. Humana Press.
- Rabilloud T., Chevallet M., Lucie S. & Lelong C. (2010) Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *J Proteomics* **73**, 2064-77.

- Raffaello A., De Stefani D. & Rizzuto R. (2012) The mitochondrial Ca²⁺ uniporter. *Cell Calcium* **52**, 16-21.
- Ramaglia V., Harapa G.M., White N. & Buck L.T. (2004) Bacterial infection and tissue-specific Hsp72, -73 and -90 expression in western painted turtles. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **138**, 139-48.
- Ramanathan R., Mancini R.A., Suman S.P. & Beach C.M. (2014) Covalent binding of 4-hydroxy-2-nonenal to lactate dehydrogenase decreases NADH formation and metmyoglobin reducing activity. *J Agric Food Chem* **62**, 2112-7.
- Ramanathan R., Mancini R.A., Suman S.P. & Cantino M.E. (2012) Effects of 4-hydroxy-2-nonenal on beef heart mitochondrial ultrastructure, oxygen consumption, and metmyoglobin reduction. *Meat Science* **90**, 564-71.
- Rao J.Y., Jin Y.S., Zheng Q., Cheng J., Tai J. & Hemstreet G.P., 3rd (1999) Alterations of the actin polymerization status as an apoptotic morphological effector in HL-60 cells. *J Cell Biochem* **75**, 686-97.
- Rasolofoharitseheno H., Mompoti W., Boudida Y. & Gagaoua M. (2015) Highlighting the Degradation of Actin in *Longissimus dorsi* Muscle of Different Species: Bovine, Ovine, Caprine, Poultry and Freshwater Fish. *British Biotechnology Journal* **7**, 169-76.
- Reddish J.M., St-Pierre N., Nichols A., Green-Church K. & Wick M. (2008) Proteomic analysis of proteins associated with body mass and length in yellow perch, *Perca flavescens*. *Proteomics* **8**, 2333-43.
- Renand G., Picard B., Touraille C., Berge P. & Lepetit J. (2001) Relationships between muscle characteristics and meat quality traits of young Charolais bulls. *Meat Science* **59**, 49-60.
- Renerre M. (1990) Factors involved in the discoloration of beef meat. *International Journal of Food Science & Technology* **25**, 613-30.
- Renerre M. (1999) Biochemical basis of fresh meat colour. In: *INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY*, pp. 344-53.
- Renerre M., Anton M. & Gatellier P. (1992) Autoxidation of purified myoglobin from two bovine muscles. *Meat Sci* **32**, 331-42.
- Richards G.P., Chao L. & Chao J. (1997) Distribution of tissue kallikreins in lower vertebrates: potential physiological roles for fish kallikreins. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* **118**, 49-58.
- Rizzuto R. & Brini M. (2013) Calcium Transport in Mitochondria. In: *Encyclopedia of Biological Chemistry* (ed. by Lane WJLD), pp. 347-52. Academic Press, Waltham.
- Robelin J., Picard B., Listrat A., Jurie C., Barboiron C., Pons F. & Geay Y. (1993) Myosin expression in semitendinosus muscle during fetal development of cattle: immunocytochemical and electrophoretic analyses. *Reproduction Nutrition Development* **33**, 25-41.
- Rodríguez-Frómata R., Rodríguez-Díaz J., Sentandreu E., Ouali A. & Sentandreu M. (2013) Proteolytic action of caspases 3 and 7 on the hydrolysis of bovine and porcine muscle myofibrillar proteins. In: *Farm animal proteomics 2013* (eds. by de Almeida A, Eckersall D, Bencurova E, Dolinska S, Mlynarcik P, Vincova M & Bhide M), pp. 278-81. Wageningen Academic Publishers.
- Ron D. & Walter P. (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 519-29.
- Ros A., Faupel M., Mees H., Oostrum J.v., Ferrigno R., Reymond F., Michel P., Rossier J.S. & Girault H.H. (2002) Protein purification by Off-Gel electrophoresis. *Proteomics* **2**, 151-6.
- Rosenvold K. & Andersen H.J. (2003) Factors of significance for pork quality-a review. *Meat Sci* **64**, 219-37.

- Ross P.L., Huang Y.N., Marchese J.N., Williamson B., Parker K., Hattan S., Khainovski N., Pillai S., Dey S., Daniels S., Purkayastha S., Juhasz P., Martin S., Bartlet-Jones M., He F., Jacobson A. & Pappin D.J. (2004) Multiplexed Protein Quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* Using Amine-reactive Isobaric Tagging Reagents. *Molecular & Cellular Proteomics* **3**, 1154-69.
- Rouchon P. (1995) Inhibiteurs de masse moléculaire élevée des cysteine et serine protéinases du muscle squelettique: purification et caractérisation physico-chimique et cinétique. Blaise Pascal University, Clermont Ferrand, France.
- Rupinder S.K., Gurpreet A.K. & Manjeet S. (2007) Cell suicide and caspases. *Vascular Pharmacology* **46**, 383-93.
- Ruusuvuori E. & Kaila K. (2014) Carbonic Anhydrases and Brain pH in the Control of Neuronal Excitability. In: *Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications* (eds. by Frost SC & McKenna R), pp. 271-90. Springer Netherlands.
- Sabourin L.A., Tamai K., Seale P., Wagner J. & Rudnicki M.A. (2000) Caspase 3 cleavage of the Ste20-related kinase SLK releases and activates an apoptosis-inducing kinase domain and an actin-disassembling region. *Mol Cell Biol* **20**, 684-96.
- Sahara S. & Yamashima T. (2010) Calpain-mediated Hsp70.1 cleavage in hippocampal CA1 neuronal death. *Biochem Biophys Res Commun* **393**, 806-11.
- Sakamaki K. & Satou Y. (2009) Caspases: evolutionary aspects of their functions in vertebrates. *J Fish Biol* **74**, 727-53.
- Sakanyan V. (2004) Puces à protéines : nouvelle approche du diagnostic des maladies infectieuses. *Antibiotiques* **6**, 185-92.
- Salway J.G. (2013) *Metabolism at a Glance*. John Wiley & Sons.
- Sami A., Mills E. & Hocquette J.-F. (2015) Relationships between DNAJA1 expression and beef tenderness: effects of electrical stimulation and post-mortem aging in two muscles. *International Journal of Agriculture and Biology* **17**, 815–20.
- Sancho R., Jaime I., Beltran J.A. & Roncales P. (1997) Degradation of Actin by Cathepsins in Beef Fibers Stored at -20°C. *Journal of Muscle Foods* **8**, 137-46.
- Sandin M., Teleman J., Malmström J. & Levander F. (2014) Data processing methods and quality control strategies for label-free LC–MS protein quantification. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1844**, 29-41.
- Sandri M. (2002) Apoptotic signaling in skeletal muscle fibers during atrophy. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* **5**, 249-53.
- Sandri M. & Carraro U. (1999) Apoptosis of skeletal muscles during development and disease. *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 1373-90.
- Sandri M., El Meslemani A.H., Sandri C., Schjerling P., Vissing K., Andersen J.L., Rossini K., Carraro U. & Angelini C. (2001) Caspase 3 expression correlates with skeletal muscle apoptosis in Duchenne and facioscapulo human muscular dystrophy. A potential target for pharmacological treatment? *J Neuropathol Exp Neurol* **60**, 302-12.
- Sarin A., Clerici M., Blatt S.P., Hendrix C.W., Shearer G.M. & Henkart P.A. (1994) Inhibition of activation-induced programmed cell death and restoration of defective immune responses of HIV+ donors by cysteine protease inhibitors. *J Immunol* **153**, 862-72.

- Sawdy J.C., Kaiser S.A., St-Pierre N.R. & Wick M.P. (2004) Myofibrillar 1-D fingerprints and myosin heavy chain MS analyses of beef loin at 36 h postmortem correlate with tenderness at 7 days. *Meat Sci* **67**, 421-6.
- Sayd T., Morzel M., Chambon C., Franck M., Figwer P., Larzul C., Le Roy P., Monin G., Cherel P. & Laville E. (2006) Proteome analysis of the sarcoplasmic fraction of pig semimembranosus muscle: implications on meat color development. *J Agric Food Chem* **54**, 2732-7.
- Schaur R.J. (2003) Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Molecular Aspects of Medicine* **24**, 149-59.
- Scheffler T.L. & Gerrard D.E. (2007) Mechanisms controlling pork quality development: The biochemistry controlling postmortem energy metabolism. *Meat Sci* **77**, 7-16.
- Schiaffino S. & Reggiani C. (2011) Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* **91**, 1447-531.
- Schick C., Pemberton P.A., Shi G.P., Kamachi Y., Cataltepe S., Bartuski A.J., Gornstein E.R., Bromme D., Chapman H.A. & Silverman G.A. (1998) Cross-class inhibition of the cysteine proteinases cathepsins K, L, and S by the serpin squamous cell carcinoma antigen 1: a kinetic analysis. *Biochemistry* **37**, 5258-66.
- Scollan N., Hocquette J.-F., Nuernberg K., Dannenberger D., Richardson I. & Moloney A. (2006) Innovations in beef production systems that enhance the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality. *Meat Science* **74**, 17-33.
- Scollan N.D., Choi N.J., Kurt E., Fisher A.V., Enser M. & Wood J.D. (2001) Manipulating the fatty acid composition of muscle and adipose tissue in beef cattle. *Br J Nutr* **85**, 115-24.
- Sentandreu M.A., Coulis G. & Ouali A. (2002) Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends in Food Science & Technology* **13**, 400-21.
- Sentandreu M.A., Fraser P.D., Halket J., Patel R. & Bramley P.M. (2010) A Proteomic-Based Approach for Detection of Chicken in Meat Mixes. *Journal of Proteome Research* **9**, 3374-83.
- Sgorbissa A., Benetti R., Marzinotto S., Schneider C. & Brancolini C. (1999) Caspase-3 and caspase-7 but not caspase-6 cleave Gas2 in vitro: implications for microfilament reorganization during apoptosis. *J Cell Sci* **112**, 4475-82.
- Shackelford S.D., Koohmaraie M., Miller M.F., Crouse J.D. & Reagan J.O. (1991) An evaluation of tenderness of the longissimus muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. *J Anim Sci* **69**, 171-7.
- Shen Q.W. & Du M. (2015) Conversion of Muscle to Meat. *Meat Quality: Genetic and Environmental Factors*, 81.
- Shinbo Y., Niki T., Taira T., Ooe H., Takahashi-Niki K., Maita C., Seino C., Iguchi-Ariga S.M.M. & Ariga H. (2005) Proper SUMO-1 conjugation is essential to DJ-1 to exert its full activities. *Cell Death Differ* **13**, 96-108.
- Sierra V. & Olivan M. (2013) Role of mitochondria on muscle cell death and meat tenderization. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov* **7**, 120-9.
- Silverman G.A., Bird P.I., Carrell R.W., Church F.C., Coughlin P.B., Gettins P.G.W., Irving J.A., Lomas D.A., Luke C.J., Moyer R.W., Pemberton P.A., Remold-O'Donnell E., Salvesen G.S., Travis J. & Whisstock J.C. (2001) The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J. Biol. Chem.* **276**, 33293.

- Silverman G.A., Whisstock J.C., Bottomley S.P., Huntington J.A., Kaiserman D., Luke C.J., Pak S.C., Reichhart J.M. & Bird P.I. (2010) Serpins flex their muscle: I. Putting the clamps on proteolysis in diverse biological systems. *J Biol Chem* **285**, 24299-305.
- Sinclair K., Lobley G., Horgan G., Kyle D., Porter A., Matthews K., Warkup C. & Maltin C. (2001) Factors influencing beef eating quality 1. Effects of nutritional regimen and genotype on organoleptic properties and instrumental texture. *Animal Science* **72**, 269-77.
- Sirover M.A. (1999) New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1432**, 159-84.
- Smili H., Gagaoua M., Becila S., Ider M., Babelhadj B., Adamou A., Picard B., Ouali A. & Boudjellal A. (2014) Exsudation de la viande de dromadaire. *Viandes et Produits Carnés. VPC-2014-30-5-5*, 1-9.
- Smulders F., Hofbauer P. & Geesink G.H. (2014) The Conversion of Muscle to Meat. In: *Meat Inspection and Control in the Slaughterhouse* (pp. 399-421. John Wiley & Sons, Ltd.
- Song Q., Wei T., Lees-Miller S., Alnemri E., Watters D. & Lavin M.F. (1997) Resistance of actin to cleavage during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 157-62.
- Spandidos A. & Rabbitts T.H. (2002) Sub-proteome Differential Display: Single Gel Comparison by 2D Electrophoresis and Mass Spectrometry. *Journal of Molecular Biology* **318**, 21-31.
- Squier M.K.T., Miller A.C.K., Malkinson A.M. & Cohen J.J. (1994) Calpain activation in apoptosis. *J Cell Physiol* **159**, 229-37.
- Stagsted J., Bendixen E. & Andersen H.J. (2004) Identification of specific oxidatively modified proteins in chicken muscles using a combined immunologic and proteomic approach. *J Agric Food Chem* **52**, 3967-74.
- Stennicke H.R. & Salvesen G.S. (1999) Catalytic properties of the caspases. *Cell Death Differ* **6**, 1054-9.
- Stennicke H.R. & Salvesen G.S. (2000) [8] - Caspase Assays. In: *Methods in Enzymology* (ed. by John CR), pp. 91-100. Academic Press.
- Suarez-Huerta N., Mosselmans R., Dumont J.E. & Robaye B. (2000) Actin depolymerization and polymerization are required during apoptosis in endothelial cells. *J Cell Physiol* **184**, 239-45.
- Suman S.P., Faustman C., Stamer S.L. & Liebler D.C. (2006) Redox instability induced by 4-hydroxy-2-nonenal in porcine and bovine myoglobins at pH 5.6 and 4 degrees C. *J Agric Food Chem* **54**, 3402-8.
- Suman S.P., Faustman C., Stamer S.L. & Liebler D.C. (2007) Proteomics of lipid oxidation-induced oxidation of porcine and bovine oxymyoglobins. *Proteomics* **7**, 628-40.
- Suman S.P. & Joseph P. (2013) Myoglobin chemistry and meat color. *Annu Rev Food Sci Technol* **4**, 79-99.
- Suman S.P., Rentfrow G., Nair M.N. & Joseph P. (2014) 2013 EARLY CAREER ACHIEVEMENT AWARD—Proteomics of muscle- and species-specificity in meat color stability. *Journal of Animal Science* **92**, 875-82.
- Surowiec I., Koistinen K.M., Fraser P.D. & Bramley P.M. (2011) Proteomic approach for the detection of chicken mechanically recovered meat. *Meat Science* **89**, 233-7.
- Svitkina T. (2013) Actin Organization. In: *Encyclopedia of Biological Chemistry* (ed. by Lane WJLD), pp. 27-35. Academic Press, Waltham.
- Swanek S.S., Morgan J.B., Owens F.N., Gill D.R., Strasia C.A., Dolezal H.G. & Ray F.K. (1999) Vitamin D3 supplementation of beef steers increases longissimus tenderness. *Journal of Animal Science* **77**, 874-81.

- Swatland H.J. (1981) Cellular heterogeneity in the response of beef to electrical stimulation. *Meat Science* **5**, 451-5.
- Szabadkai G. & Rizzuto R. (2004) Participation of endoplasmic reticulum and mitochondrial calcium handling in apoptosis: more than just neighborhood? *FEBS Lett* **567**, 111-5.
- Takahashi K., Taira T., Niki T., Seino C., Iguchi-Ariga S.M.M. & Ariga H. (2001) DJ-1 Positively Regulates the Androgen Receptor by Impairing the Binding of PIASxα to the Receptor. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 37556-63.
- Takano J., Tomioka M., Tsubuki S., Higuchi M., Iwata N., Itohara S., Maki M. & Saido T.C. (2005) Calpain mediates excitotoxic DNA fragmentation via mitochondrial pathways in adult brains: evidence from calpastatin mutant mice. *J Biol Chem* **280**, 16175-84.
- Takayama S., Reed J.C. & Homma S. (2003) Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene* **22**, 9041-7.
- Talmadge R.J. & Roy R.R. (1993) Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *Journal of Applied Physiology* **75**, 2337-40.
- Tarze A., Deniaud A., Le Bras M., Maillier E., Molle D., Larochette N., Zamzami N., Jan G., Kroemer G. & Brenner C. (2007) GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. *Oncogene* **26**, 2606-20.
- Tassy C. (1998) Purification et caractérisation d'un inhibiteur de sérine protéinases à partir de muscle squelettique de bovin. *PhD Thesis, EPHE, Paris*.
- Tassy C., Herrera-Mendez C.H., Sentandreu M.A., Aubry L., Bremaud L., Pelissier P., Delourme D., Brillard M., Gauthier F., Leveziel H. & Ouali A. (2005) Muscle endopin 1, a muscle intracellular serpin which strongly inhibits elastase: purification, characterization, cellular localization and tissue distribution. *Biochem J* **388**, 273-80.
- Taylor R., Tassy C., Briand M., Robert N., Briand Y. & Ouali A. (1995) Proteolytic activity of proteasome on myofibrillar structures. *Mol Biol Rep* **21**, 71-3.
- Taylor R.G., Papa I., Astier C., Ventre F., Benyamin Y. & Ouali A. (1997) Fish muscle cytoskeleton integrity is not dependent on intact thin filaments. *J Muscle Res Cell Motil* **18**, 285-94.
- Te Pas M.F., Hoekman A.J. & Smits M.A. (2011) Biomarkers as management tools for industries in the pork production chain. *Journal on Chain and Network Science* **11**, 155-66.
- Te Pas M.F., Jansen J., Broekman K.C., Reimert H. & Heuven H.C. (2009) Postmortem proteome degradation profiles of longissimus muscle in Yorkshire and Duroc pigs and their relationship with pork quality traits. *Meat Sci* **83**, 744-51.
- Te Pas M.F., Kruijt L., Pierzchala M., Crump R.E., Boeren S., Keuning E., Hoving-Bolink R., Hortos M., Gispert M., Arnau J., Diestre A. & Mulder H.A. (2013) Identification of proteomic biomarkers in M. Longissimus dorsi as potential predictors of pork quality. *Meat Sci* **95**, 679-87.
- Teltathum T. & Mekchay S. (2009) Proteome Changes in Thai Indigenous Chicken Muscle during Growth Period. *Int J Biol Sci* **5**, 679-85.
- Terlouw C. (2005) Stress reactions at slaughter and meat quality in pigs: genetic background and prior experience: A brief review of recent findings. *Livestock Production Science* **94**, 125-35.
- Terlouw C.E. (2015) Stress Reactivity, Stress at Slaughter, and Meat Quality. *Meat Quality: Genetic and Environmental Factors*, 199.

- Terlouw E.M., Arnould C., Auperin B., Berri C., Le Bihan-Duval E., Deiss V., Lefevre F., Lensink B.J. & Mounier L. (2008) Pre-slaughter conditions, animal stress and welfare: current status and possible future research. *Animal* **2**, 1501-17.
- Terlouw E.M.C., Cassar-Malek I., Picard B., Bourguet C., Deiss V., Arnould C., Berri C., Le Bihan-Duval E., Lefevre F. & Lebret B. (2015) Stress en élevage et à l'abattage : impacts sur les qualités des viandes. *INRA Productions Animales* **28**, 169-82.
- Terova G., Addis M.F., Preziosa E., Pisanu S., Pagnozzi D., Biosa G., Gornati R., Bernardini G., Roggio T. & Saroglia M. (2011) Effects of postmortem storage temperature on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) muscle protein degradation: analysis by 2-D DIGE and MS. *Proteomics* **11**, 2901-10.
- Tews D.S. (2002) Apoptosis and muscle fibre loss in neuromuscular disorders. *Neuromuscular Disorders* **12**, 613-22.
- Tews D.S. (2005) Muscle-fiber apoptosis in neuromuscular diseases. *Muscle Nerve* **32**, 443-58.
- Thiede B., Höhenwarter W., Krah A., Mattow J., Schmid M., Schmidt F. & Jungblut P.R. (2005) Peptide mass fingerprinting. *Methods* **35**, 237-47.
- Thompson J. (2002) Managing meat tenderness. *Meat Science* **62**, 295-308.
- Tornberg E. (2005) Effects of heat on meat proteins - Implications on structure and quality of meat products. *Meat Sci* **70**, 493-508.
- Touraille C. (1994) Incidence des caractéristiques musculaires sur les qualités organoleptiques des viandes. *Renc. Rech. Rum* **1**, 169-76.
- Toyohara H., Makinodan Y., Tanaka K. & Ikeda S. (1983) Detection of calpastatin and a trypsin inhibitor in carp muscle. *Agricultural and Biological Chemistry* **47**, 1151-4.
- Troy D.J. (2006) 4 Hot-Boning of Meat: A New Perspective. *Advanced technologies for meat processing*, 73.
- Turk V., Turk B. & Turk D. (2001) Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *The EMBO Journal* **20**, 4629-33.
- Tyers M. & Mann M. (2003) From genomics to proteomics. *Nature* **422**, 193-7.
- Uchida K. & Stadtman E.R. (1993) Covalent attachment of 4-hydroxynonenal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. A possible involvement of intra- and intermolecular cross-linking reaction. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 6388-93.
- Unlu M., Morgan M.E. & Minden J.S. (1997) Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* **18**, 2071-7.
- Updike M.S., Zerby H.N., Sawdy J.C., Lilburn M.S., Kaletunc G. & Wick M.P. (2005) Turkey breast meat functionality differences among turkeys selected for body weight and/or breast yield. *Meat Sci* **71**, 706-12.
- Valberg S.J., Townsend D. & Mickelson J.R. (1998) Skeletal muscle glycolytic capacity and phosphofructokinase regulation in horses with polysaccharide storage myopathy. *Am J Vet Res* **59**, 782-5.
- Valin C. (1995) Animal and muscle variability in tenderisation: Possible causes. *Ouali, D., et al*, 435-42.
- Valin C., Touraille C., Vigneron P. & Ashmore C.R. (1982) Prediction of lamb meat quality traits based on muscle biopsy fibre typing. *Meat Sci* **6**, 257-63.
- Van de Water B., Kruidering M. & Nagelkerke J.F. (1996) F-actin disorganization in apoptotic cell death of cultured rat renal proximal tubular cells. *Am J Physiol* **270**, F593-603.

- van de Wiel D.F. & Zhang W.L. (2007) Identification of pork quality parameters by proteomics. *Meat Sci* **77**, 46-54.
- van Engeland M., Kuijpers H.J.H., Ramaekers F.C.S., Reutelingsperger C.P.M. & Schutte B. (1997) Plasma Membrane Alterations and Cytoskeletal Changes in Apoptosis. *Exp Cell Res* **235**, 421-30.
- van Genderen H., Kenis H. & Dumont E. (2003) Membrane alterations in dying cells. *Cell Proliferation and Apoptosis*, 192.
- van Genderen H.O., Kenis H., Hofstra L., Narula J. & Reutelingsperger C.P. (2008) Extracellular annexin A5: functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization. *Biochim Biophys Acta* **1783**, 953-63.
- Vanags D.M., Porn-Ares M.I., Coppola S., Burgess D.H. & Orrenius S. (1996) Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *J Biol Chem* **271**, 31075-85.
- Vartiainen M.K., Guettler S., Larijani B. & Treisman R. (2007) Nuclear actin regulates dynamic subcellular localization and activity of the SRF cofactor MAL. *Science* **316**, 1749-52.
- Vasiliou V., Pappa A. & Estey T. (2004) Role of human aldehyde dehydrogenases in endobiotic and xenobiotic metabolism. *Drug Metab Rev* **36**, 279-99.
- Vasiliou V., Thompson D.C., Smith C., Fujita M. & Chen Y. (2012) Aldehyde dehydrogenases: From eye crystallins to metabolic disease and cancer stem cells. *Chem Biol Interact* **16**, 00233-5.
- Veiseth-Kent E., Grove H., Færgestad E.M. & Fjæra S.O. (2010) Changes in muscle and blood plasma proteomes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) induced by crowding. *Aquaculture* **309**, 272-9.
- Venable J.D., Dong M.Q., Wohlschlegel J., Dillin A. & Yates J.R. (2004) Automated approach for quantitative analysis of complex peptide mixtures from tandem mass spectra. *Nat Methods* **1**, 39-45.
- Verbeke W., Perez-Cueto F.J., Barcellos M.D., Krystallis A. & Grunert K.G. (2010) European citizen and consumer attitudes and preferences regarding beef and pork. *Meat Sci* **84**, 284-92.
- Verhoven B., Schlegel R.A. & Williamson P. (1995) Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med* **182**, 1597-601.
- Vignon X., Beaulaton J. & Ouali A. (1989) Ultrastructural localization of calcium in post-mortem bovine muscle: a cytochemical and X-ray microanalytical study. *Histochem J* **21**, 403-11.
- Viswanathan S., Unlu M. & Minden J.S. (2006) Two-dimensional difference gel electrophoresis. *Nat. Protocols* **1**, 1351-8.
- Voisinet B.D., Grandin T., O'Connor S.F., Tatum J.D. & Deesing M.J. (1997) Bos indicus-cross feedlot cattle with excitable temperaments have tougher meat and a higher incidence of borderline dark cutters. *Meat Sci* **46**, 367-77.
- Voss O.H., Batra S., Kolattukudy S.J., Gonzalez-Mejia M.E., Smith J.B. & Doseff A.I. (2007) Binding of Caspase-3 Prodomain to Heat Shock Protein 27 Regulates Monocyte Apoptosis by Inhibiting Caspase-3 Proteolytic Activation. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 25088-99.
- Wang D.Y., Zhang M.H., Liu F., Zhu Y.Z. & Xu W.M. (2014) Purification and characterisation of a phosphatidylcholine-binding protein from duck Biceps femoris muscle. *Animal Production Science* **54**, 194-9.
- Wang K.K. (2000) Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci* **23**, 20-6.

- Wang K.K., Posmantur R., Nadimpalli R., Nath R., Mohan P., Nixon R.A., Talanian R.V., Keegan M., Herzog L. & Allen H. (1998) Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis. *Arch Biochem Biophys* **356**, 187-96.
- Wang W., Eddy R. & Condeelis J. (2007) The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis. *Nat Rev Cancer* **7**, 429-40.
- Westermeyer R. & Marouga R. (2005) Protein Detection Methods in Proteomics Research. *Bioscience Reports* **25**, 19-32.
- Whisstock J.C., Silverman G.A., Bird P.I., Bottomley S.P., Kaiserman D., Luke C.J., Pak S.C., Reichhart J.M. & Huntington J.A. (2010) Serpins flex their muscle: II. Structural insights into target peptidase recognition, polymerization, and transport functions. *J Biol Chem* **285**, 24307-12.
- Wiedemann N., Frazier A.E. & Pfanner N. (2004) The protein import machinery of mitochondria. *J Biol Chem* **279**, 14473-6.
- Wilkins M.R., Pasquali C., Appel R.D., Ou K., Golaz O., Sanchez J.-C., Yan J.X., Gooley A.A., Hughes G., Humphery-Smith I., Williams K.L. & Hochstrasser D.F. (1996) From Proteins to Proteomes: Large Scale Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Amino Acid Analysis. *Nat Biotech* **14**, 61-5.
- Willie A.H. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**, 251-306.
- Woessner J.F. (1961) The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **93**, 440-7.
- Wolfe R.R. (2006) The underappreciated role of muscle in health and disease. *Am J Clin Nutr* **84**, 475-82.
- Wood D.E., Thomas A., Devi L.A., Berman Y., Beavis R.C., Reed J.C. & Newcomb E.W. (1998) Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis. *Oncogene* **17**, 1069-78.
- Wood W., Turmaine M., Weber R., Camp V., Maki R.A., McKercher S.R. & Martin P. (2000) Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos. *Development* **127**, 5245-52.
- Wood Z.A., Schroder E., Robin Harris J. & Poole L.B. (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* **28**, 32-40.
- Wright M.M., Howe A.G. & Zarembek V. (2004) Cell membranes and apoptosis: role of cardiolipin, phosphatidylcholine, and anticancer lipid analogues. *Biochemistry and Cell Biology* **82**, 18-26.
- Wu G., Farouk M.M., Clerens S. & Rosenvold K. (2014a) Effect of beef ultimate pH and large structural protein changes with aging on meat tenderness. *Meat Science* **98**, 637-45.
- Wu W., Fu Y., Therkildsen M., Li X.-M. & Dai R.-T. (2014b) Molecular Understanding of Meat Quality Through Application of Proteomics. *Food Reviews International* **31**, 13-28.
- Yamashita H., Avraham S., Jiang S., London R., Van Veldhoven P.P., Subramani S., Rogers R.A. & Avraham H. (1999) Characterization of Human and Murine PMP20 Peroxisomal Proteins That Exhibit Antioxidant Activity in Vitro. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 29897-904.
- Yamazaki Y., Tsuruga M., Zhou D., Fujita Y., Shang X., Dang Y., Kawasaki K. & Oka S. (2000) Cytoskeletal disruption accelerates caspase-3 activation and alters the intracellular membrane reorganization in DNA damage-induced apoptosis. *Exp Cell Res* **259**, 64-78.
- Yanagihara S., Nakaoka H., Hara K. & Ishihara T. (1991) Purification and Characterization of Serine Proteinase from White. *Nippon Suisan Gakkaishi* **57**, 133-42.

- Yang F., Sun X., Beech W., Teter B., Wu S., Sigel J., Vinters H.V., Frautschy S.A. & Cole G.M. (1998) Antibody to caspase-cleaved actin detects apoptosis in differentiated neuroblastoma and plaque-associated neurons and microglia in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **152**, 379-89.
- Ye J., Zhao J., Hoffmann-Rohrer U. & Grummt I. (2008) Nuclear myosin I acts in concert with polymeric actin to drive RNA polymerase I transcription. *Genes Dev* **22**, 322-30.
- Youle R.J. & Karbowski M. (2005) Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 657-63.
- Yu A., Byers D.M., Ridgway N.D., McMaster C.R. & Cook H.W. (2000) Preferential externalization of newly synthesized phosphatidylserine in apoptotic U937 cells is dependent on caspase-mediated pathways. *Biochim Biophys Acta* **1487**, 296-308.
- Yu H., Bao E.D., Zhao R.Q. & Lv Q.X. (2007) Effect of transportation stress on heat shock protein 70 concentration and mRNA expression in heart and kidney tissues and serum enzyme activities and hormone concentrations of pigs. *Am J Vet Res* **68**, 1145-50.
- Yu J., Tang S., Bao E., Zhang M., Hao Q. & Yue Z. (2009) The effect of transportation on the expression of heat shock proteins and meat quality of M. longissimus dorsi in pigs. *Meat Sci* **83**, 474-8.
- Zamora F., Aubry L., Sayd T., Lepetit J., Lebert A., Sentandreu M.A. & Ouali A. (2005) Serine peptidase inhibitors, the best predictor of beef ageing amongst a large set of quantitative variables. *Meat Sci* **71**, 730-42.
- Zamora F., Debiton E., Lepetit J., Lebert A., Dransfield E. & Ouali A. (1996) Predicting variability of ageing and toughness in beef M. Longissimus lumborum et thoracis. *Meat Sci* **43**, 321-33.
- Zanetti E., Masi A., Pivato M., Tolin S., Trentin A., Guler C., Yalcin S. & Cassandro M. (2013) A note on protein expression changes in chicken breast muscle in response to time in transit before slaughtering. *Proteome Science* **11**, 34.
- Zapata I., Zerby H.N. & Wick M. (2009) Functional proteomic analysis predicts beef tenderness and the tenderness differential. *J Agric Food Chem* **57**, 4956-63.
- Zelko I.N., Mariani T.J. & Folz R.J. (2002) Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine* **33**, 337-49.
- Zhang M., Wang D., Huang W., Liu F., Zhu Y., Xu W. & Cao J. (2013a) Apoptosis during postmortem conditioning and its relationship to duck meat quality. *Food Chem* **138**, 96-100.
- Zhang X., Pan D., Cao J. & Wu Z. (2013b) Changes in the major caspases involved in cytoskeletal degradation of goose muscle during prolonged aging. *Food Research International* **51**, 603-10.
- Zhang Y., Fonslow B.R., Shan B., Baek M.-C. & Yates J.R. (2013c) Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. *Chemical Reviews* **113**, 2343-94.
- Zhao C., Tian F., Yu Y., Luo J., Hu Q., Bequette B., Baldwin Vi R., Liu G., Zan L., Scott Updike M. & Song J. (2012a) Muscle transcriptomic analyses in Angus cattle with divergent tenderness. *Mol Biol Rep* **39**, 4185-93.
- Zhao C., Tian F., Yu Y., Luo J., Mitra A., Zhan F., Hou Y., Liu G., Zan L., Updike M.S. & Song J. (2012b) Functional genomic analysis of variation on beef tenderness induced by acute stress in angus cattle. *Comp Funct Genomics* **2012**, 756284.

- Zheng A., Luo J., Meng K., Li J., Zhang S., Li K., Liu G., Cai H., Bryden W.L. & Yao B. (2014) Proteome changes underpin improved meat quality and yield of chickens (*Gallus gallus*) fed the probiotic *Enterococcus faecium*. *BMC Genomics* **15**, 1167.
- Zhou A., Wei Z., Read R.J. & Carrell R.W. (2006) Structural mechanism for the carriage and release of thyroxine in the blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 13321-6.
- Zietkiewicz S., Krzewska J. & Liberek K. (2004) Successive and synergistic action of the Hsp70 and Hsp100 chaperones in protein disaggregation. *J Biol Chem* **279**, 44376-83.
- Zwaal R.F.A., Comfurius P. & Bevers E.M. (2005) Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **62**, 971-88.

النوعية الحسية للحم البقر جد متغيرة وتعتمد على عدة عوامل مترابطة قبل و بعد الذبح . الهدف من هذه الدراسة هو شرح بنهج آلي تقلب عدة معايير لجودة اللحم من أنواع مختلفة من ال بقري (العجول، الأبقار والثيران) من مختلف السلالات باستخدام من جهة، خصائص العضلات ومن جهة أخرى، قائمة من بروتينات المؤشرات الحيوية ال 21 لطراوة اللحم. النتائج الرئيسية تجلب معارف جديدة في الآليات التي تحكم تطور الطراوة، اللون ودرجة الحموضة لحوم البقر. يتناول الجزء الأول تأثير عوامل التغير: درجة حرارة الطبخ وهيئة التذوق على الصفات الحسية. وكشفت النتائج أنه بغض النظر عن نوع الحيوانات وأصل هيئة التذوق، علامات الطراوة و العصرية عند درجة حرارة الطهي 55 درجة مئوية أعلى من 74 درجة مئوية. وبالعكس يلاحظ أن النكهة والتقييم الشامل أعلى عند 74 درجة مئوية من 55 درجة مئوية. ويتناول الجزء الثاني من الأطروحة العلاقة بين الخصائص العضلية والصفات الحسية . وتظهر النتائج بشكل رئيسي إلى أن نشاط الإنزيم المؤكسدة الإيزوسيترات نازعة هيدروجين (ICDH) ونسب السلسلة الثقيلة للميوزين البطيء (MyHC-I) تسمح بتمييز السلالات بغض النظر عن نوع الحيوان . بينما لا يوجد ترابط بين الخصائص العضلية مع الصفات الحسية المقيمة . الجزء الثالث الذي يشكل قلب هذه الأطروحة يتناول استخدام وفرة من المؤشرات الحيوية للشرح و التنبؤ بالمعايير الرئيسية لجودة اللحم. نماذج تنبؤ جميع السلالات (Aberdeen Angus ، Limousine وBlonde d'Aquitaine) تشرح القليل جدا (10-17 %) من تباين الطراوة. ولكن النماذج المبنية سلالة بسلالة أكثر قوة و تشرح ما يصل إلى 70 % من التباين في طراوة العضلات *Semitendinosus* و *Longissimus thoraci* للثيران المدروسة. نماذج التنبؤ المبنية بالعضلات و السلالات تكشف الاختلافات. بعض المؤشرات الحيوية شائعة للعضلتين و /أو ثلاث سلالات. بالأخص Hsp70-1A/B يظهر كعلامة عامة للطراوة، في حين أن البعض الآخر لعضلة و /أو سلالة معينة. هذه الأطروحة هي أول من وضع معادلات التنبؤ للون لحم البقر ابتداء من المؤشرات الحيوية و من عضلة أخذت أقل من ساعة بعد الذبح. البروتينات Hsp70-1A/B و μ -calpain تم العثور عليها مرتبطة إلى حد كبير مع معلمات اللون . من هذه النتائج، اقترحت آلية بيولوجية لشرح هذه العلاقة الكبيرة ما يوحى إلى تدخل ظاهرتين : أكسدة البروتينات و الموت الخلوي . من جهة أخرى ، ترتبط العديد من المؤشرات الحيوية مع pH_{45min} ، pH_{3h} و pH_u . تم العثور على أن Prdx6 مرتبطة بالمعلمات الثلاث من درجة الحموضة وقد تم اقتراح آلية بيولوجية . ويتناول الجزء الأخير من هذه الأطروحة ال interactomics بتطوير شبكات الارتباط الأولى بين المؤشرات الحيوية . وقد حددت النتائج المسارات الأيضية والبروتينات (DJ-1 ، Hsp70-Grp75 و petites Hsp)، قد تكون ذات صلة قوية بنوعية اللحم بغض النظر عن العضلة و السلالة . المخطط الآلي التكاملية لغالبية المؤشرات الحيوية المدروسة لو صف الآليات التي قد تحكم خطوات تحول العضلة (بعد الذبح) إلى لحم قد اقترح قبل إعطاء النتائج الأولية بشأن إدماج السربينات في قائمة المؤشرات الحيوية.

كلمات المفتاح: لحم البقر؛ الخصائص العضلية؛ الصفات الحسية؛ الطراوة؛ اللون؛ المؤشرات الحيوية؛ الآليات البيولوجية؛ التنبؤ.

Résumé

La qualité sensorielle de la viande bovine est très variable et dépend de nombreux facteurs interdépendants pré et post-abattage. L'objectif de cette thèse est d'expliquer par une approche mécanistique la variabilité de plusieurs critères de qualité de la viande provenant de différents types de bovins (bœufs, génisses et taurillons) de diverses races en utilisant d'une part, les caractéristiques musculaires et d'autre part, une liste de 21 protéines biomarqueurs de tendreté. Les principaux résultats contribuent à enrichir nos connaissances concernant les mécanismes gouvernant le développement de la tendreté, la couleur et le pH de la viande bovine. Une première partie porte sur l'effet des facteurs de variations (température de cuisson et jury de dégustation) sur les qualités sensorielles. Quel que soit le type d'animal et l'origine du jury, les notes de tendreté et de jutosité sont plus élevées à température de cuisson de 55°C qu'à 74°C. A l'inverse, les notes de flaveur et d'appréciation globale, sont plus élevées à 74°C qu'à 55°C. Dans la deuxième partie de la thèse nous avons tenté de mettre en relation les caractéristiques musculaires et les qualités sensorielles. Les résultats montrent principalement que l'activité de l'enzyme oxydative isocitrate déshydrogénase (ICDH) et des proportions de chaînes lourdes de myosine lente (MyHC-I) permettent de discriminer les races indépendamment du type d'animal. Cependant, aucune caractéristique musculaire n'était corrélée aux qualités sensorielles évaluées. La troisième partie constituant le cœur de ce travail de thèse a porté sur l'utilisation de l'abondance des biomarqueurs pour l'explication et la prédiction des principaux critères de qualité de la viande. Les modèles de prédiction toutes races confondues (Aberdeen Angus, Blonde d'Aquitaine et Limousine), expliquent très peu (10 à 17%) de la variabilité de la tendreté. En revanche, les modèles construits race par race sont plus performants et expliquent jusqu'à 70% de la variabilité de la tendreté des muscles *Longissimus thoracis* et *Semitendinosus* des taurillons étudiés. Les modèles de prédiction construits par muscle et par race révèlent des différences. Certains biomarqueurs sont communs aux deux muscles et/ou aux trois races. En particulier, Hsp70-1A/B apparaît comme un marqueur générique de la tendreté, tandis que d'autres sont muscle et/ou race spécifique. Ce travail a permis, pour la première fois à élaborer des équations de prédiction de la couleur de la viande bovine à partir de biomarqueurs et sur un muscle prélevé moins d'une heure après l'abattage. Les protéines Hsp70-1A/B et μ -calpaïne sont fortement corrélées entre elles et avec les paramètres de couleur. A partir de ces résultats, l'oxydation des protéines et l'apoptose comme mécanisme biologique a été proposé pour expliquer cette forte corrélation. Par ailleurs, de nombreux biomarqueurs sont corrélés aux pH_{45min} , pH_{3h} et pH_u . La Prdx6 a été trouvée associée aux trois paramètres de pH et un mécanisme biologique a été proposé. La dernière partie de cette thèse a porté sur l'interactomique en élaborant les premiers réseaux de corrélations entre biomarqueurs. Les résultats ont identifié les voies métaboliques et les protéines (DJ-1, Hsp70-Grp75 et petites Hsp), susceptibles d'être liées de manière robuste à la qualité de la viande indépendamment du muscle et de la race. Un schéma mécanistique intégratif de la majorité des biomarqueurs étudiés pour décrire les mécanismes susceptibles de gouverner les étapes de la transformation du muscle *post-mortem* en viande a été proposé avant de donner les résultats préliminaires portant sur l'intégration des serpins dans la liste des biomarqueurs.

Mots clés : Viande bovine ; Caractéristiques musculaires ; Qualités sensorielles ; Tendreté ; Couleur ; Biomarqueurs ; Mécanismes biologiques ; Prédiction

Abstract

Meat sensory quality is very variable and depends on many interrelated pre- and post-slaughter factors. The objective of this thesis is to explain by a mechanistic view the variation of several meat quality traits coming from different types of cattle (steers, heifers and young bulls) of numerous breeds using muscle characteristics and a list of 21 biomarkers of meat tenderness. Findings from this thesis provide new insights in the biological mechanisms underlying the development of tenderness, color and pH of beef meat. The first part deals with the effect of cooking temperature and origin of panelists on the scores of meat sensory qualities. The results showed that irrespectively of animal type and origin of the panelists, tenderness and juiciness scores were higher at an end-point cooking temperature of 55°C than at 74°C. In contrast, beef flavor and overall liking scores were higher at 74°C than at 55°C. The second part of the thesis focuses on the relationship between muscle characteristics and sensory qualities. The results mainly show that the activity of the oxidative enzyme isocitrate dehydrogenase (ICDH) and the proportions of the slow myosin heavy chain (MyHC-I) allow discrimination of breeds irrespectively of animal type. However, none of the muscle characteristic was correlated with the evaluated sensory quality traits. The third and principal part of this thesis focuses on the use of the biomarkers abundances to explain and predict the main meat quality traits. The prediction models taking in to account all young bulls breeds (Aberdeen Angus, Limousin and Blonde d'Aquitaine), explain only a small part (10 - 17%) of the variability of tenderness. However, the prediction power of the models constructed by breed were good, explaining up to 70% of the variability of tenderness of *Longissimus thoracis* and *Semitendinosus* muscles of the young bulls. Prediction models built by muscle and breed showed many differences. Some biomarkers were common to both muscles and/or three breeds. Particularly, Hsp70-1A/B appears as a potential generic biomarker of tenderness, while other proteins were muscle and/or breed specific. In addition, this thesis is the first to show prediction equations of beef meat color and pH using the list of 21 biomarkers. Its originality consists in the use of muscle samples sampled early *post-mortem*. Hsp70-1A/B and μ -calpain were highly correlated with each other and with all the meat color parameters. Based on these results, a biological mechanism was proposed to explain this strong correlation, suggesting the involvement of two phenomena: protein oxidation and apoptosis. Moreover, many biomarkers were correlated with pH_{45min}, pH_{3h} and ultimate pH. Prdx6 was associated with the three parameters of pH and a possible biological mechanism was proposed. The last part of this thesis focuses on the use of interactomics and shows the correlation networks between the 21 biomarkers studied. The networks identified the metabolic pathways and proteins (DJ-1, Hsp70-Grp75 and small Hsp) which may be strongly linked to meat quality traits irrespectively of muscle and breed. Finally, an integrative mechanistic scheme using the biomarkers studied is proposed to describe the mechanisms that govern the steps of *post-mortem* muscle to meat conversion and preliminary results on the integration of serpins in the list of biomarkers are presented.

Keywords : Beef meat; Muscle characteristics; Sensory qualities; Tenderness; Meat color; Biomarkers; Biological mechanisms; Prediction