HAL open science

Recherche de biomarqueurs plasmatiques pour prédire la qualité de la viande bovine

Sabrina Boudon

To cite this version:

Sabrina Boudon. Recherche de biomarqueurs plasmatiques pour prédire la qualité de la viande bovine. Agronomie. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2020. Français. NNT : 2020CLFAC004 . tel-02901653

HAL Id: tel-02901653

https://hal.inrae.fr/tel-02901653v1

Submitted on 22 Oct 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.

UNIVERSITÉ Clermont Auvergne

ÉCOLE DOCTORALE

DES SCIENCES DE LA VIE, SANTÉ, AGRONOMIE & ENVIRONNEMENT

Thèse

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

Spécialité : Génétique, Physiologie, Pathologie, Nutrition, Microbiologie, Santé et Innovation

Soutenue publiquement le ***10 Mars 2020*** *par*

Sabrina BOUDON

RECHERCHE DE BIOMARQUEURS PLASMATIQUES POUR PRÉDIRE LA QUALITÉ DE LA VIANDE BOVINE

Devant le jury constitué de

Pr. Hervé REMIGNON (Professeur, GenPhySE, INRAE, ENVT Université de Toulouse)	**Président et Rapporteur**
Dr. Florence PINET (Directrice de Recherches, INSERM, Institut Pasteur de Lille)	**Rapporteur**
Dr. Cécile BERRI (Directrice de Recherches, INRAE, Université de Tours)	**Examinateur**
Dr. Romain PHILIPPE (Chargé de Recherches, INRAE, Université de Limoges)	**Examinateur**
Dr. Ayhan KOCER (Maître de conférences, GReD, UCA Clermont-Ferrand)	**Examinateur**

Préparée sous la direction de

Dr. Isabelle CASSAR-MALEK (Directrice de Recherches, INRAE, Clermont-Ferrand)

Mme. Joëlle HENRY-BERGER (Ingénieure de Recherche, GReD, UCA Clermont-Ferrand)

Dans l'Unité Mixte de Recherche sur les Herbivores (UMRH),
Equipe Biomarqueurs, INRAE Centre Auvergne Rhône-Alpes, 63122 St-Genès-Champanelle

Financée par la Région Auvergne-Rhône-Alpes et le FEDER

La Région Auvergne-Rhône-Alpes

INRAE la science pour la vie, l'humain, la terre

VetAgro Sup

L'Europe s'engage en Auvergne avec le Fonds européen de développement régional (FEDER)

Projet co-financé par l'Union européenne

À la mémoire de mon grand-père

À ma famille et mes ami(e)s

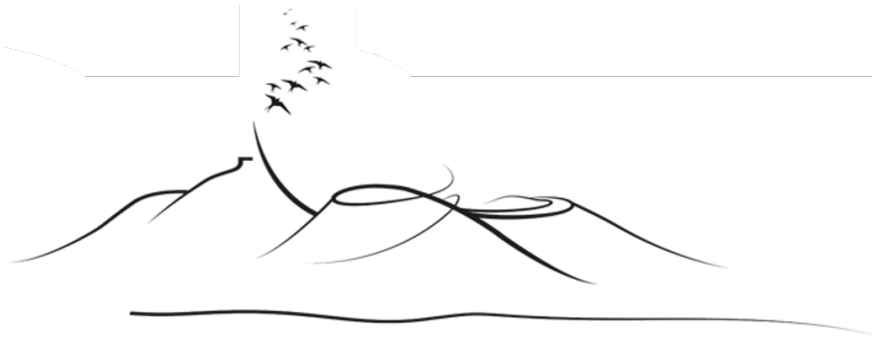
Et parce que tu es si cher à mon cœur,

À toi Joël

Ma vie, les Sciences...

« Pour ce qui est de l'avenir, il ne s'agit pas de le prévoir mais de le rendre possible »

Antoine de Saint-Exupéry



Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer mes plus sincères remerciements aux membres de mon jury de thèse : Mr. Ayhan KOCER (Maître de conférences, CNRS, GReD, Inserm, UCA Clermont-Ferrand) qui m'a fait l'honneur de présider ce jury ; Mme. Florence PINET (Directrice de Recherches, Institut Pasteur de Lille) et Mr. Hervé REMIGNON (Professeur, GenPhySE, INRA, ENVT Université de Toulouse) qui ont accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit ; et Mme. Cécile BERRI (Directrice de Recherches, INRA, Université de Tours) et Mr. Romain PHILIPPE (Chargé de Recherches, INRA, Université de Limoges) qui ont accepté d'être les examinateurs de ce travail de thèse.

Je remercie le Fonds Européen de Développement Régional (FEDER) et la Région Auvergne-Rhône-Alpes qui ont financé ma bourse de thèse. Je remercie également la Région Occitanie et la filière Indication Géographique Protégée (IGP) « Génisse Fleur d'Aubrac » pour le financement d'une part des travaux de recherche de l'analyse protéomique.

Je remercie les membres de mon comité de thèse pour leur suivi et leurs conseils : Mme. Bénédicte LEBRET (INRA, Rennes), Cécile PIOT (Société CHARAL, Egletons, Corrèze), Pierre Val (CNRS, GReD, Inserm, UCA Clermont-Ferrand). Votre expertise scientifique, ainsi que les échanges constructifs que nous avons eus tout au long du suivi de ma thèse m'ont permis d'aiguiller au mieux mes travaux de thèse. Je souhaite également remercier Carole DELAVAUD (INRA, Theix), membre de ce comité mais aussi ma tutrice de thèse. Je souhaite t'exprimer toute ma reconnaissance pour ta disponibilité, ta gentillesse et pour le soutien si précieux que tu m'as accordé durant ces trois années. Tu as toujours su trouver les mots pour m'encourager à prendre confiance en moi durant les périodes les plus stressantes. Tu m'as également énormément aidée à relativiser les choses, à penser à moi, à favoriser mes attentes, pour trouver un équilibre et avancer pas à pas. Aussi, je n'oublierai pas ces moments de longues discussions plus personnelles qui ont été si bénéfiques à mon épanouissement.

C'est tout naturellement que je tiens à remercier Mme. Isabelle CASSAR-MALEK, ma directrice de thèse, et Mme. Joëlle HENRY-BERGER, ma co-directrice, de m'avoir donné ma chance. Vous m'avez fait confiance ce jour du 3 Février 2016 en me permettant de remette le pied à l'étrier et enfin concrétiser un rêve professionnel. Toute ma reconnaissance à Isabelle pour ton encadrement et tes précieux conseils durant ces trois années. Je me rappelle de ce jour où tu m'as dit « mon rôle est de te faire grandir durant ces trois années, mon rôle est de faire de toi un chercheur… ». Aujourd'hui je t'exprime toute ma gratitude et mon respect car tu m'as permis de grandir, et de m'exprimer dans ce domaine professionnel qui me tient tant à cœur, un domaine que j'ai eu si peur de devoir abandonner contre mon gré. Merci de m'avoir permis de voyager et de découvrir l'Australie. Ces trois ans ont été intenses tant physiquement que psychologiquement, et à bien des niveaux, mais cette expérience m'a montré que dans la vie tout est

possible : il suffit de garder confiance en soi et de se donner les moyens ! Toute ma reconnaissance à toi Joëlle, toi qui m'as connue alors que je n'étais encore qu'une étudiante de Licence. Je te remercie pour tes précieux conseils dans un domaine qui m'était encore si inconnu lorsque j'ai débuté cette thèse : la bio-informatique. Lorsque j'ai postulé pour ce projet de thèse, je vous avais exprimé que la bio-informatique était pour moi « un challenge ». Aujourd'hui, je t'exprime toute ma reconnaissance car tu m'as permis d'acquérir de précieuses connaissances qui vont me servir dans mon avenir de chercheur. Je te remercie également pour ta patience, pour ta gentillesse et pour ton soutien dans les périodes les plus stressantes. Je n'oublierai pas nos petits moments détentes entre filles lors des déjeuners le midi, des moments épicés qui ont fait naître une sincère amitié entre nous ! Aussi, c'est un honneur pour moi d'être la dernière étudiante que tu encadres. Ce sera bientôt pour toi l'heure de débuter une nouvelle vie à la campagne... Alors je tenais à te souhaiter une merveilleuse future retraite bien méritée. Même si je sais qu'elle ne sera pas de tout repos, car toi et l'inactivité ne sont pas trop compatibles, profite des tiens, de tes enfants et petits-enfants, profite de cette nouvelle vie qui te comble déjà de bonheur !

Cette thèse a été réalisée au sein de l'équipe Biomarqueurs de l'Unité Mixte de Recherche sur les Herbivores. Je tiens à remercier tous les membres de cette équipe pour votre accueil, pour votre soutien et votre sympathie. Parfois le monde est petit pour réunir les Lozériens. Ainsi, je commence par te remercier Muriel BONNET pour m'avoir accueillie dans l'équipe, merci pour ta disponibilité, pour tes conseils et pour ta gentillesse. Un grand merci à toi Brigitte PICARD, merci pour ta gentillesse et ta bienveillance. Tu as toujours su te rendre disponible quand j'en ai eu le plus besoin. Avec toi j'ai tellement appris, ta patience m'a permis d'acquérir des compétences qui vont me servir dans l'avenir. Malgré les aléas de la vie et un emploi du temps bien chargé, tu as toujours pris le temps de m'apporter ton aide, ton soutien. Ta présence et ta positive attitude m'ont vraiment aidé à tenir. Arnaud DELAVAUD, je tenais à te remercier tout particulièrement pour ton aide précieuse pour la réalisation de l'étude protéomique muscle et plasma. Merci pour ta bonne humeur, pour ta disponibilité et ton investissement. C'était tellement agréable de travailler avec une personne passionnée comme toi, merci pour tes conseils précieux, autant théoriques que pratiques. Entre l'étude du plasma et les analyses protéomiques à la plateforme, nous avons dû perdre quelques cheveux mais nous n'avons rien lâché ! Je tiens à remercier sincèrement Nicole FREDOT-DUNOYER pour ton investissement dans les extractions protéiques et dans la mise en place d'une méthode de quantification des protéines plasmatiques. Nous n'avons malheureusement pas pu concrétiser ce travail, mais ton expertise et tes conseils m'ont beaucoup appris. Nicole, tu auras été bien plus qu'une collègue de travail. Entre échanges culinaires et confidences, ta présence au cours de ces trois années a été essentielle à mon équilibre et à mon bien-être. Je n'oublierai pas ta gentillesse, ta bienveillance, tes valeurs et ta disponibilité, une personne juste exceptionnelle ! Agnès THOMAS, merci également à toi pour ta bienveillance et pour ta gentillesse, j'ai beaucoup apprécié nos échanges professionnels mais aussi plus personnels. J'apprécie beaucoup tes valeurs et je tenais à te

remercier pour ton soutien et pour tes conseils, toujours très objectifs dans tous les domaines. Denys DURAND, je tenais également à te remercier pour ta disponibilité et ton expertise, toujours bienveillante, à bien des niveaux. Avec toi j'ai beaucoup appris, beaucoup travaillé sur ma réflexion scientifique mais aussi professionnelle et personnelle. Tu as des connaissances tellement étendues que c'est un honneur d'avoir pu échanger avec toi, merci pour ta passion et pour ta gentillesse. Merci à Arnaud, David CHAREYRON et Julien SOULAT d'avoir réalisé les prélèvements musculaires et plasmatiques sur les génisses Fleur d'Aubrac. Votre investissement dans ce projet m'a permis de réaliser une partie de mes travaux de thèse. Merci à Sylvie BARDOU-VALETTE et Martine TOURRET pour vos conseils théoriques et pratiques lors des prélèvements des échantillons musculaires et/ou plasmatiques. Merci à Céline BOBY pour ton aide dans le traitement de données issues de la revue systématique de la littérature. Merci à Dominique GRUFFAT pour ton soutien, pour ta bonne humeur et pour ta disponibilité. Merci de m'avoir accordé du temps, merci pour tes conseils si précieux. Merci à Mylène DELOSIERE pour ta disponibilité, merci de m'avoir donné des avis qui m'ont permis d'avancer. Merci à Christophe CHAMBON et à Didier VIALA de la Plate-Forme d'Exploration du Métabolisme (PFEM, Theix) pour les analyses protéomiques des échantillons musculaires et plasmatiques. Je tenais également à vous remercier pour votre disponibilité et pour votre investissement tout au long de ma thèse. Merci à Isabelle ORTIGUES, Isabelle VEISSIER et Michel DOREAU pour vos précieux conseils lors des ateliers de rédaction scientifiques. Merci à toi Isabelle ORTIGUES pour ton expertise, pour ta disponibilité et pour ta gentillesse lors de la rédaction de mon article sur la méta-analyse. Merci à Yannick FAULCONNIER, pour ton soutien et pour ces moments d'échanges toujours dans la bonne humeur. Jordann DOMAGALSKI, merci pour ta disponibilité et pour ta réactivité sur le plan informatique. Christine LEROUX, Laurence BERNARD, José PIRES et Sébastien BES, merci pour votre soutien et pour votre bonne humeur. Je remercie également les membres de l'équipe PERAQ, Anne, Benoit, Cyril, Didier, Emilie et Pascale qui ont partagé mon quotidien. Merci à Didier pour tes valeurs, pour ta gentillesse et pour tes conseils pour la rénovation. Merci Pascale BERAUD pour ta bonne humeur, pour ton humour. Merci de m'avoir fait découvrir l'Auvergne et de si beaux endroits. Je tiens aussi à remercier Simon et Julien de l'équipe abattoir, Merci à l'équipe Herbipôle des Cèdres avec qui j'ai pu avoir des échanges très enrichissants au cours de ces trois années. Je souhaite également remercier l'équipe de direction et l'équipe PIGALE qui m'ont accompagnée au cours de ces trois années. Annie ROYET, merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur et pour ta bienveillance. Tu as toujours su prendre le temps pour répondre à mes questions administratives. Merci Maryse TEYSSEDRE et Pascal CHAMPCIAUX pour votre disponibilité et pour votre gentillesse. Nathalie GOCEL et Florence BOURGES, merci pour votre bienveillance et pour votre disponibilité. J'ai beaucoup apprécié votre bonne humeur et vos sourires tous les matins. Florence, je me souviendrai de nos moments d'échanges. Merci pour ta disponibilité, pour ton écoute et ton précieux soutien…Lozérien ! Merci à tous les doctorants et post-doctorants avec qui j'ai pu échanger et partager de bons moments tout au long de ces trois années : Hélène, Jeanne, Julien,

Louise, Lucas, Luciano, Lucille, Madeline, Mohammed, Pierre-Alexis, Pauline, Solveig. Adeline avec qui j'ai passé de beaux moments de rigolades mais aussi sportifs. Thaïs, merci pour ces bons moments passés ensemble également. Daoud, j'ai beaucoup apprécié travailler avec toi. Merci pour toutes ces compétences que tu m'as transmises, merci pour ta disponibilité et pour ta patience car il en fallait pour arriver à combiner nos deux domaines : les mathématiques et la biologie ! Nos moments d'échange et de rigolades qui ont fait naître une sincère amitié.

Mais le déroulement de ma thèse ne se serait pas si bien passé sans la présence de mes proches. Evidemment j'adresse un immense merci à mes parents. Merci papa et maman de me soutenir dans les bons moments comme dans les moins bons, merci d'être toujours là pour moi jour après jour… La vie n'a pas toujours été simple pour vous et vous avez toujours tout fait pour que je ne manque de rien, pour que j'arrive à m'épanouir autant personnellement que professionnellement. Aujourd'hui grâce à vous je réalise mon rêve professionnel et je vous en suis infiniment reconnaissante. Tonton Yves, tu as aussi beaucoup contribué à la concrétisation de ce rêve. Merci à toi pour ta présence et pour ton soutien à bien des niveaux depuis toujours. Enfin, je tenais à te remercier papi Olivier d'avoir été là. Merci pour ton sourire, pour ton soutien, pour tes prières et ta présence qui est si chère à mon cœur. Dans la vie, le destin fait parfois si bien les chose et ma pensée, transcrite au travers de l'épigraphe de ma thèse, ne pouvait pas être mieux choisie : *« Pour ce qui est de l'avenir, il ne s'agit pas de le prévoir mais de le rendre possible »* - Antoine de Saint-Exupéry -.

Sarah, ma sœurette de cœur, merci d'être là pour moi tout simplement. Depuis que « des poneys Lozériens » ont fait naître cette amitié, tu es toujours là dans les bons comme dans les pires moments de ma vie, et ceci malgré la distance. En toi j'ai trouvé la sœur que j'ai toujours rêvé d'avoir, merci d'être toi, merci d'être là !! Alexia et Laetitia, merci pour cette si belle amitié. Merci pour vos merveilleuses valeurs et pour votre soutien qui m'apportent tellement, je ne saurais assez vous remercier. Merci pour ces beaux moments passés ensemble, merci d'être toujours là pour moi quoi qu'il arrive, même quand je veux faire un saut en « paracôte » ! Hervé, merci à toi pour cette sincère amitié que le sport à fait naître. Merci d'être là pour moi comme un frère, merci pour ton soutien si précieux. Mais « Wonder woman » ne serait pas « Wonder woman » sans un coaching au « café dégueulasse », qui a plutôt bien fonctionné d'ailleurs !! Cette thèse aura également été l'occasion de rencontrer de belles personnes… et surtout de faire naître une belle amitié avec toi Océane. Dès le début on a beaucoup apprécié passer des moments ensemble, se balader avec nos toutous, parler chevaux et surtout discuter, discuter, discuter !!!! Avec le temps notre amitié perdure même si parfois on a eu du mal à trouver du temps pour se voir. Merci à toi d'être là, merci pour ton amitié, pour ton sourire et ta sincérité.

Je tenais également à remercier mes beaux-parents, Sylvette et Yves qui ont tellement fait pour moi. Merci pour votre gentillesse, pour votre compréhension et surtout pour votre soutien sans faille. Merci pour vos délicates attentions qui m'ont permis d'aborder au mieux cette fin de thèse. Aussi, merci pour

tout ce temps que vous m'avez consacré afin de finaliser ce manuscrit et pour le chocolat aux amandes anti-stress qui m'aura sauvé la mise de nombreuses fois !! Notre famille et votre présence m'apporte beaucoup, merci d'être les personnes que vous êtes…

Joël, mon chéri…Tu comptes tellement pour moi que je ne sais par où commencer. Tu es rentré dans ma vie et j'ai enfin commencé à « vivre simplement ». Tu es mon guide, celui qui sait toujours trouver les mots pour me réconforter quand je doute. Merci de m'avoir supportée dans ces moments difficiles, et de m'avoir permis de rebondir quand j'étais prête à lâcher. Merci de croire en moi, merci pour ta patience et pour ton écoute qui m'apportent tellement chaque jour. Merci pour ton humour, pour ton sourire et pour tous ces beaux moments que nous vivons ensemble (et avec notre Wiesel !). Tu es le vrai régulateur de ma vie, tu es mon amour et mon équilibre, celui qui fait de moi la femme heureuse et épanouie que je suis devenue aujourd'hui…

Enfin, certaines personnes quittent notre monde trop tôt mais comment ne pas les citer tellement elles ont compté. Je tiens à rendre hommage à un ange parti trop tôt… Merci à toi papi d'avoir partagé tous ces merveilleux moments avec moi. Merci de m'avoir transmis de si belles valeurs, merci de veiller sur moi chaque jour. Je t'avais promis d'accomplir ce rêve un jour alors comment ne pas te rendre hommage… Je tenais également à rendre hommage à une personne qui a beaucoup compté, mon petit Dédé, tu devrais être là aujourd'hui pour fêter ça avec nous !

Résumé

Le secteur de l'élevage bovin est en attente d'outils permettant de prédire et piloter les qualités sensorielles de la viande, notamment la tendreté qui est une priorité pour les consommateurs et pour la filière. La qualité de la viande est un phénotype complexe qui ne peut être évalué que tardivement après l'abattage des animaux et maturation de la viande. Depuis plus de 15 ans, des recherches ont permis d'identifier des marqueurs de la qualité de la viande utilisables sur échantillons musculaires prélevés par biopsie ou sur carcasse. Cependant, des travaux récents ont rapporté des relations parfois inverses entre l'abondance de certains biomarqueurs et la tendreté de la viande selon le muscle ou le type d'animal considéré. Ainsi, l'identification de biomarqueurs « génériques » et peu-invasifs s'impose comme un enjeu pour le secteur bovin.

Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse a été d'identifier de potentiels biomarqueurs plasmatiques pour prédire la tendreté de la viande bovine. Afin de répondre à cet objectif, mes travaux de thèse se sont articulés autour de deux approches: (i) une approche d'intégration de données moléculaires combinée à une analyse bio-informatique (approche *in-silico*) pour prédire le sécrétome plasmatique ; (ii) une approche expérimentale, basée sur la stratégie protéomique Shotgun LC MS/MS, pour identifier des candidats plasmatiques et des candidats musculaires (muscles *Longissimus* et *Rectus abdominis*) à partir de groupes de génisses IGP Fleur d'Aubrac contrastées pour la tendreté. Afin de caractériser ce phénotype complexe, les groupes extrêmes analysés ont été déterminés selon trois systèmes d'évaluation de la tendreté (Warner Brazler Shear Force, sensoriel et index synthétique combinant ces deux systèmes).

La combinaison de ces deux approches a permis de proposer pour la première fois une liste de 107 protéines plasmatiques candidates pour évaluer la tendreté de la viande bovine, parmi lesquelles 32 sont retrouvées dans des QTL de tendreté. Cette stratégie a également permis de compléter la liste de candidats musculaires déjà connus. Les données agrégées dans la littérature sont majoritairement associées à des bovins mâles (taurillons et bouvillons), ainsi ces travaux permettent de proposer pour la première fois une liste de candidats musculaires et plasmatiques pour la tendreté de génisses. Ces travaux de thèse ont également permis de compléter les connaissances sur le déterminisme de la tendreté, notamment *via* l'implication des voies de sécrétion vésiculaires (micro-vésiculaire et macro-vésiculaire (exosome)) et les cils primairesces résultats pourraient permettre de proposer des outils de phénotypage pour prédire « le potentiel tendreté » du vivant de l'animal, mais aussi de valoriser des filières de qualité, d'orienter/segmenter les marchés et de proposer des conduites d'élevage adaptées au potentiel des animaux.

Mots clés : Agrégation et intégration de données, Shotgun LC-MS/MS, protéomique, sécrétome, biomarqueurs plasmatiques, tendreté de la viande bovine

Abstract

A challenge for the ruminant sector is to predict and manage the phenotypic traits related to meat production and quality especially tenderness, a priority of the beef industry. Meat quality is a complex phenotype that can be evaluated only after slaughtering and meat ageing. Previous research efforts have investigated the potential of muscle-derived markers to assess meat quality from biopsy or on carcass samples. However, recent studies have reported relationship sometimes inverse between protein abundance and tenderness depending on the muscle type or animal considered. Thus, the identification of "generic" and low-invasive biomarkers is an issue for the beef sector.

In this context, the objective of my PhD thesis was to discover plasma candidate biomarkers to predict and manage beef tenderness. To meet this objective, my research included two complementary approaches: (i) a molecular data aggregation from publicly available data combined with bioinformatics (*in silico* approach) to reconstruct the secretome associated with tenderness; (ii) a proteomic analysis (Shotgun LC-MS/MS) to identify plasma and muscle candidates (*Longissimus* et *Rectus abdominis muscles*) from contrasted tenderness groups of PGI Fleur d'Aubrac heifers. Extreme groups of tenderness were established based on three evaluation methods: Warner Bratzler Shear Force, sensory analysis, and according to a synthetic index which combines the previous two evaluation systems.

Thanks to the combination of the two approaches, I can propose for the first time an atlas of 107 plasma candidate proteins to assess the tenderness in cattle, of which 32 are included in tenderness QTL. I could also complete the list of muscle candidates reported in the scientific literature. While published data report mainly data on male bovines (steers, bull calves), my PhD work allows to propose for the first time a list of plasma and novel muscle candidates for heifer tenderness. My results also contribute to improve knowledge on tenderness determinism, notably through the involvement of extracellular vesicles (micro-vesicular (EVs), macro-vesicular (exosomes)), and the primary cilia. This knowledge will help to design phenotypic tools for "tenderness potential" prediction, in living animal and to add value to high-quality beef sector.

Keywords: Data aggregation and integration, Shotgun LC-MS/MS, proteomics, secretome, plasma biomarkers, beef tenderness

Valorisations des travaux de recherche

Articles en préparation ou soumis dans des journaux à comité de lecture

Boudon S, Henry-Berger J, Cassar-Malek I. 2020. Aggregation of omics data and secretome prediction enables the discovery of candidate plasma biomarkers for beef tenderness. International Journal of Molecular Sciences. DOI: 10.3390/ijms21020664. *Publiée le 19 Janvier 2020.*

Boudon S, Cassar-Malek I. Dataset of 469 proteins related to beef tenderness (DATAPAPER). E*n préparation.*

Boudon S, Cassar-Malek I. 2019. Dataset of proteins related to beef tenderness. Dataverse, data INRAE. DOI: 10.15454/7DKRQD. *Déposé le 19 Décembre 2019.*

Boudon S, Ounaissi D, Viala D, Monteils V, Picard B, Cassar-Malek I.. Label free shotgun proteomics for the identification of protein biomarkers for beef tenderness in muscle and plasma of heifers. Journal of Proteomics. DOI : 10.1016/j.jprot.2020.103685. Publiée le 15 Avril 2020 (en ligne).

Boudon S, Ounaissi D, Viala D, Monteils V, Picard B, Cassar-Malek I. Analyse du proteome plasmatique et musculaire des animaux extrêmes classés selon la tendreté du muscle *Rectus abdominis. En préparation.*

Communications Scientifiques

Boudon, S., Cassar-Malek, I. Biomarqueurs plasmatiques de la qualité de la viande bovine. Journées annuelles des doctorants et post-doctorants de l'UMRH, 31 Mars 2017, INRA site de Theix, Clermont-Ferrand, France. *Communication orale.*

Boudon, S., Cassar-Malek, I. Plasma biomarkers for beef tenderness. CSIRO, 26 Octobre 2017, Brisbane, Australie. *Communication orale.*

Boudon, S., Cassar-Malek, I. Biomarqueurs plasmatiques de la qualité de la viande bovine. Journées annuelles des doctorants et post-doctorants de l'UMRH, 29 Mars 2018, INRA site de Theix, Clermont-Ferrand, France. *Communication orale.*

Boudon, S., Henry-Berger, J. et Cassar-Malek, I. (2018). Quest for plasma biomarkers for beef tenderness. Journée de l'Ecole Doctorale SVSAE, 14-15 Juin 2018, Clermont-Ferrand, France. *Communication Flash et Poster.*

Boudon, S., Henry-Berger, J. et Cassar-Malek, I. (2018). Quest for plasma biomarkers for beef tenderness. 10th International Symposium on the Nutrition of herbivores (ISNH, 2-6 Septembre 2018), Clermont-Ferrand, France. *Poster n°476*.

Boudon, S., Cassar-Malek, I. (2018). 10th International Symposium on the Nutrition of herbivores (ISNH, 2-6 Septembre 2018), Clermont-Ferrand, France. *Workshop on Evaluation of animal performances and products quality : current state of methods and indicators.*

Boudon, S., Soulat, J., Monteils, V., Cassar-Malek, I. et Picard, B. (2019). L'influence des pratiques d'élevage sur la qualité des carcasses et de la viande Fleur d'Aubrac. Assemblée Générale de l'Association Fleur d'Aubrac, 2 Septembre 2019, Antrenas, France. *Communication orale.*

Table des matières

PRÉAMBULE **1**

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE5

Chapitre 1 : "Du muscle à la viande…" **5**

I. Le tissu musculaire squelettique : un tissu composite 5

II. Des propriétés contractiles et métaboliques particulières 9

III. La viande : un produit issu de la transformation *post-mortem* du muscle 13

IV. Les systèmes protéolytiques *post-mortem* et l'apoptose 18

V. Les qualités nutritionnelles de la viande bovine 23

VI. Les qualités sensorielles de la viande bovine 25

VII. Les facteurs de variations des qualités sensorielles 29

Chapitre 2 : Les biomarqueurs au service de la qualité de la viande bovine **38**

I. Démarches pour l'identification de biomarqueurs 38

II. Les biomarqueurs et la qualité de la viande 42

III. La protéomique des tissus et des bio-fluides : des sources de biomarqueurs ? 56

Chapitre 3 : L'agrégation de données publiées pour la découverte de biomarqueurs peu-invasifs **68**

I. L'agrégation de données publiques pour la recherche de biomarqueurs 68

II. La sécrétion des protéines 75

OBJECTIFS DE LA THÈSE **91**

RÉSULTATS **94**

Publication 1 ..... **94**

Data paper (publication 2) **101**

Dataset of 469 proteins related to beef tenderness **102**

Publication 3 ..... **102**

Publication 4 ..... **107**

DISCUSSION GÉNÉRALE **113**

CONCLUSION ET PERSPECTIVES **122**

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES **124**

ANNEXES **163**

Liste des figures

Figure 1. Usage et occupation des sols de France métropolitaine p.1

Figure 2. Principe des systèmes de production durable de ruminants Français p.1

Figure 3. Production mondiale de viandes d'herbivores p.1

Figure 4. Evolution de la consommation journalière (g/jour) de produits carnés en France p.2

Figure 5. Organisation structurale du muscle strié squelettique p.5

Figure 6. Schématisation du mécanisme de la contraction musculaire p.10

Figure 7. Voie de la glycolyse p.11

Figure 8. Intégration de la voie de la glycolyse avec la production de lactate et la voie oxydative p.11

Figure 9. Le cycle de CORI p.12

Figure 10. La chaîne respiratoire mitochondriale p.12

Figure 11. Différentes phases de la transformation du muscle en viande incluant la phase de mort cellulaire programmée p13

Figure 12. Les trois voies de la mort cellulaire p.15

Figure 13. Voies d'activation de l'apoptose par les caspases p.16

Figure 14. Structure cristallographique de l'apoptosome avec la caspase 9 de *Bos taurus* p.17

Figure 15. Structure cristallographique du proteasome 20S de *Bos taurus* p.20

Figure 16. Représentation schématique des précurseurs de caspase identifiés chez l'homme ou exprimés uniquement chez certaines espèces animales p.21

Figure 17. Structure cristallographique typique d'une SERPIN (SERPINA1 de *Bos taurus)* p.22

Figure 18. Représentation cristallographique du mode d'action des SERPINs p.23

Figure 19. Modifications chimiques du pigment myoglobine liées à son oxygénation et au statut oxydatif du fer héminique p.26

Figure 20. Le système CIELAB p.26

Figure 21. Appareil de mesure de la force de cisaillement de Warner Bratzler p.28

Figure 22. Représentation schématiques des principaux facteurs influençant la tendreté p.28

Figure 23. Formule mathématique pour déterminer l'indice synthétique de la tendreté Idx p.28

Figure 24. Evolution avec l'âge de la proportion des différents types de fibres musculaires dans le muscle *Semitendinosus* de bovins p.30

Figure 25. Bovins de type « culard » p.32

Figure 26. Maturation et conservation de la viande bovine p.35

Figure 27. Stratégie à suivre pour le développement de nouveaux biomarqueurs protéiques p.38

Figure 28. Principaux éléments d'un spectromètre de masse p.42

Figure 29. Principe de l'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE) associée à la spectrométrie de masse p.43

Figure 30. Principe du de l'électrophorèse 1D-SDS-PAGE couplée à la nano-chromatographie liquide (nano-LC-MS/MS) p.44

Figure 31. Représentation schématique du principe de l'ionisation electrospray p.44

Figure 32. Les fonctions de régulation des SERPINs p.55

Figure 33. Le sang et le plasma p.57

Figure 34. Composition du protéome plasmatique p.58

Figure 35. Stratégies pour l'analyse du plasma (ou sérum) en protéomique p.58

Figure 36. Différentes méthodes d'appauvrissement utilisées pour éliminer les protéines majoritaires du plasma (ou sérum) p.59

Figure 37. Principe de la technologie ProteoMiner® (BioRad) p.61

Figure 38. Evolution du nombre de publications traitant de « méta-analyse » ou « revue systématique » entre 1948 et 2020 p.68

Figure 39. Du Big-Data à la réutilisation de données pour la biologie predictive p.68

Figure 40. Principales étapes d'une « revue systématique de la littérature » p.69

Figure 41. Démarche suivie par les auteurs d'une revue systématique de la littérature ou méta-analyse p.70

Figure 42. Méthode PI(E)CO pour définir la question d'intérêt d'une revue systématique de la littérature p.71

Figure 43. Les échanges au niveau du muscle strié squelettique p.74

Figure 44. Schématisation des voies classiques de sécrétion p.75

Figure 45. Voies de sécrétion des protéines p.78

Figure 46. Biogénèse et sécrétion des vésicules extracellulaires p.82

Figure 47. Les voies de biogénèse des exosomes p.84

Figure 48. Les trois destinations possibles des vésicules intra-luminales intégrées dans les MVE décrites à ce jour p.86

Figure 49. Le système endosome/lysosome p.86

Figure 50. Les mécanismes de dégradation du contenu des ILV par les lysosomes p.87

Figure 51. Structure cristallographique d'un complexe SNARE de *Bos taurus* p.88

Figure 52. Zone géographique d'élevage de l'IGP Fleur d'Aubrac p.103

Figure 53. Formule mathématique pour déterminer l'indice synthétique de la tendreté Idx p.104

Figure 54. Appréciation de la tendreté des muscles *Longissimus* et *Rectus abdominis* issus de génisses IGP Fleur d'Aubrac p.108

Figure 55. Gene Ontology des protéines différentielles identifiées dans les échantillons musculaires et plasmatiques des génisses IGP Fleur d'Aubrac p.110

Figure 56. Diagramme de Venn des protéines différentielles identifiées dans les plasmas LM et RA p.118

Figure 57. Fréquence des annotations de Gene Ontologie des protéines identifiées dans les échantillons musculaires de LM et RA p.119

Figure 58. Diagramme de Venn des protéines différentielles identifiées dans les muscles LM et RA p.119

Figure 59. Représentation schématique des résultats obtenus au cours de mes travaux de thèse p.120

Figure 60. Gene Ontologie des 107 protéines candidates plasmatiques identifiées à partir de l'ensemble de mes travaux de thèse p.121

Figure 61. Intéractome des 107 protéines candidates identifiées au cours de mes travaux de thèse p. 121 bis (A3)

Liste des tableaux

Tableau 1. Caractéristiques fonctionnelles, structurales et métaboliques des fibres musculaires du bovin p.10

Tableau 2. Caractéristiques des méthodes de révélation des gels électrophorèses bidimensionnelles (2-DE) p.43

Tableau 3. Résumé des techniques utilisées pour les études protéomiques menées chez le bovin p.45

Tableau 4. Liste non-exhaustive des biomarqueurs protéiques identifiés par une approche protéomique et associés à la variabilité de la tendreté de la viande bovine p.46-48

Tableau 5. Liste non-exhaustive des avantages et inconvénients de l'utilisation de tissus ou de bio-fluides dans un contexte de recherche de biomarqueurs p.56

Tableau 6. Principales caractéristiques des exosomes, microvésicules et corps apoptotiques p.82

Tableau 7. Bilan des 75 protéines plasmatiques proposées à l'issue des travaux rapportés dans la publication 1 p.99

Listes des annexes

Annexe 1. Regroupement sémantique REVIGO (Muscle RA) p.163 et suite

Annexe 2. Regroupement sémantique REVIGO (Muscle LM) p.163 et suite

Annexe 3. Regroupement sémantique REVIGO (Plasma RA) p.163 et suite

Annexe 4. Regroupement sémantique REVIGO (Plasma LM) p.163 et suite

Annexe 5. 107 candidats plasmatiques proposés à l'issue de mes travaux de thèse p.163 et suite

Annexe 6. **Boudon, S., Henry-Berger, J. et Cassar-Malek, I.** (2018). Quest for plasma biomarkers for beef tenderness. 10th International Symposium on the Nutrition of herbivores (ISNH, 2-6 Septembre 2018), Clermont-Ferrand, France. *Poster n°476*. p.163 et suite

Préambule

Les enjeux de la production de viande

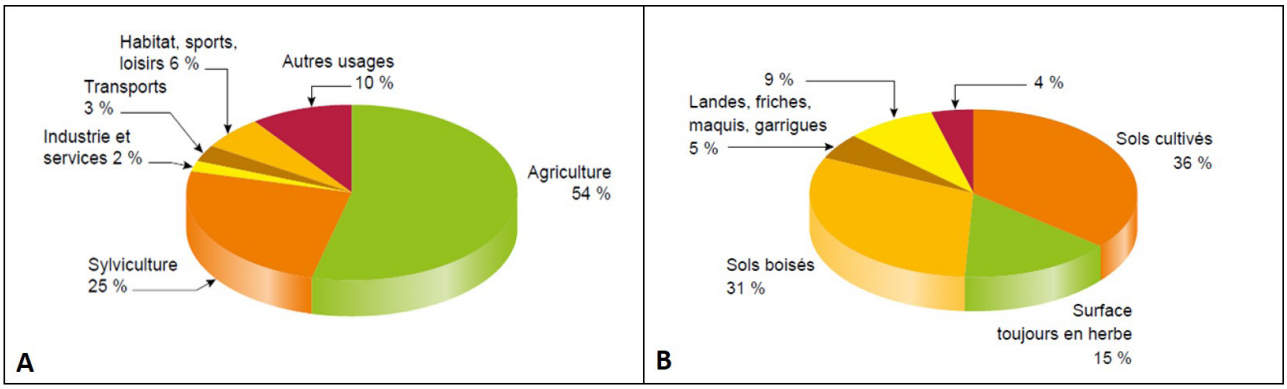


Figure 1. Usage et occupation des sols de France métropolitaine
Usage des sols (A). Occupation des sols (B).
Source : Agreste - Teruti-Lucas, 2015

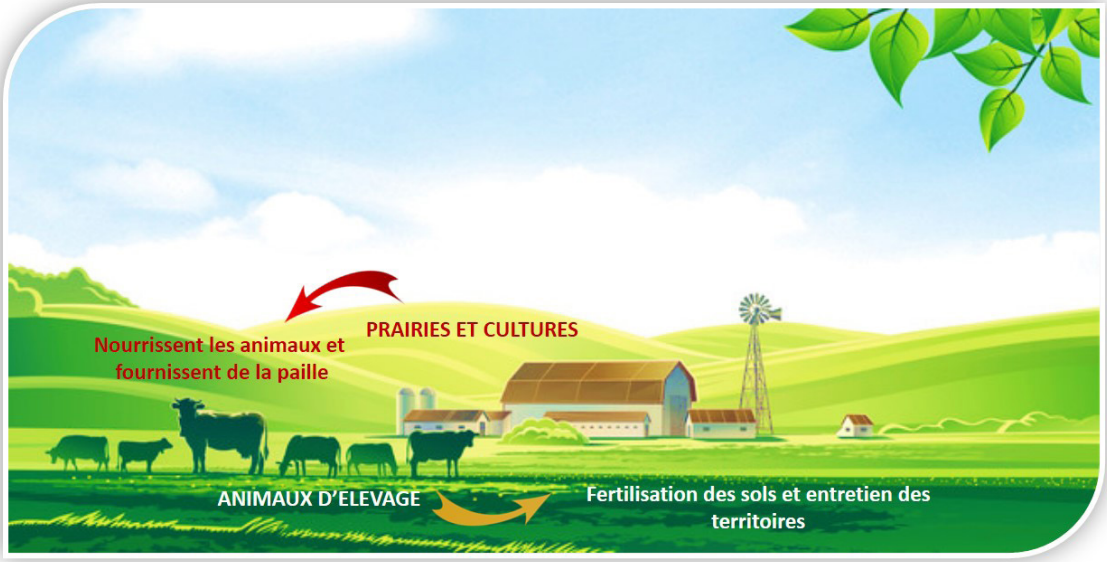


Figure 2. Principe des systèmes de production durable de ruminants Français
Source: la-viande.fr, consulté le 16/11/2019

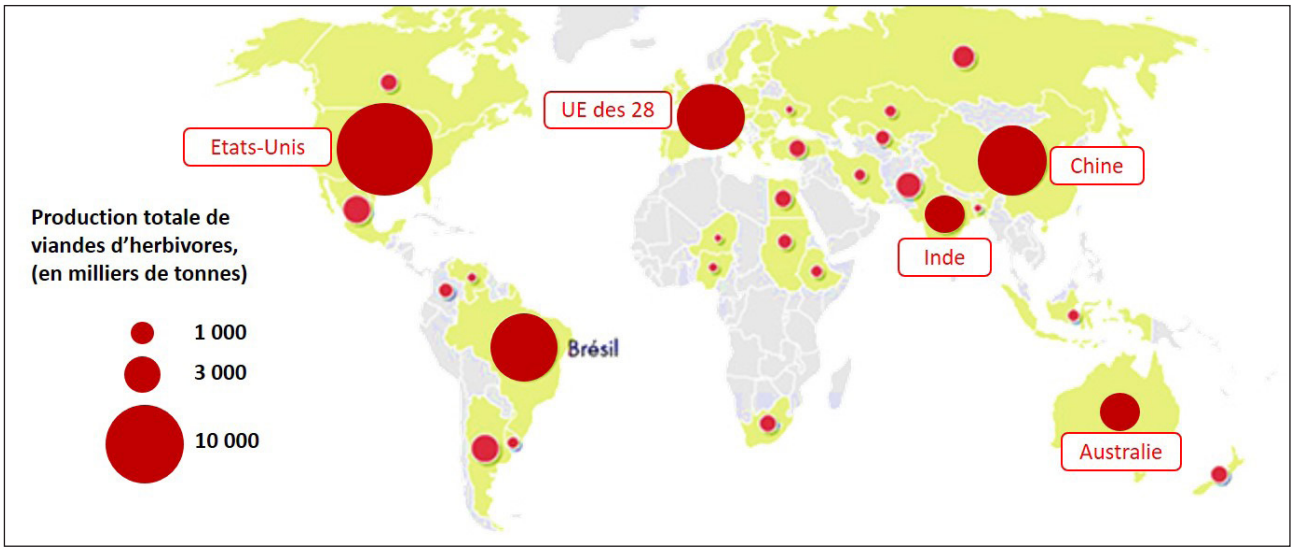


Figure 3. Production mondiale de viandes d'herbivores
Source: la-viande.fr, consulté le 16/11/2019

Les enjeux de la production de viande

Le mot viande vient du latin « *vivenda* » qui signifie « ce qui sert à la vie ». À l'origine, le mot viande faisait référence à toute sorte de nourriture, puis il s'est progressivement restreint pour ne désigner aujourd'hui que les produits carnés. Cette évolution de langage illustre bien la place particulière et l'importance de la viande dans l'alimentation humaine.

Les modes de vie et les habitudes alimentaires modernes ont beaucoup évolué au cours de ces dernières décennies. La place de la viande dans nos assiettes est également sujette à controverse. Des questions en lien avec la santé, la nutrition, la cause et le bien-être animal, mais aussi l'environnement ont fait l'objet de nombreux débats publics. Les acteurs concernés par ces débats sont issus de secteurs très variés et leurs positions sont souvent divergentes, voire opposées. Ce débat autour de la viande touche un secteur économique important. Selon les estimations statistiques de l'Agreste 2019 du ministère de l'agriculture (Source : http://agreste.agriculture.gouv.fr/), la France compte près de 700 000 exploitants agricoles et plus de 180 000 personnes occupant des emplois associés à l'élevage (soit 3,2% de la population active). Par ailleurs, les entreprises de transformation des viandes représentent 25% des entreprises alimentaires et 30% des salariés du secteur. Selon les données Agreste 2017, sur les 55 millions d'hectares que compte le territoire Français métropolitain, 54% des sols ont un usage agricole **(Figure 1)**. En France, les ruminants sont majoritairement élevés dans des systèmes durables herbagers (prairies) ou mixtes (cultures et prairies). Ces systèmes permettent de nourrir à hauteur de 90% les animaux avec les fourrages et céréales produits sur l'exploitation. Ainsi, le sol produit une grande partie de l'alimentation des animaux, et en contrepartie les animaux valorisent ce sol et entretiennent les territoires [Picard and Kondjoyan, 2019]. De plus, ces systèmes quasi-autonomes évitent l'importation et le transport de fourrages ou céréales, et permettent ainsi d'entretenir localement une biodiversité agricole et une rotation culturale variée (Source : https://www.la-viande.fr/) **(Figure 2)**. Au niveau mondial, les principaux producteurs de viande bovine sont les États-Unis, le Brésil, l'Europe puis la Chine **(Figure 3)**. Le continent américain fournit à lui seul plus de 50% de la production de viande bovine mondiale. Avec près de 19 millions de bovins, répartis dans plus de 75 000 exploitations spécialisées, la France est le premier producteur de viande bovine de l'Union Européenne des 28 (UE). La France est aussi le plus grand consommateur de viande en Europe (près de 135 g de produit carnés par jour et par personne)

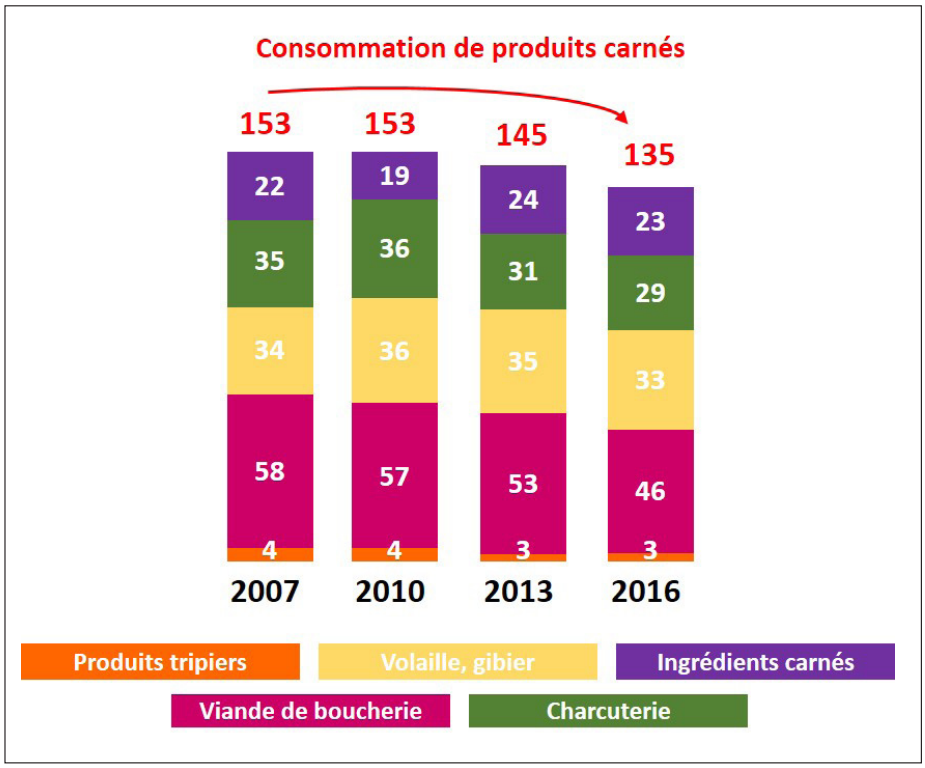


Figure 4. Evolution de la consommation journalière (g/jour) de produits carnés en France

CCAF: Comportements et consommations alimentaires en France, viande de boucherie (bœuf, veau, agneau, cheval), Ingrédients carnés (viandes fraîches ou surgelées, brutes ou hachées, transformées ou non dans un plat tout prêt).

Source: Enquête CCAF 2007, 2010, 2013 et 2016

(Source : https://www.credoc.fr). Cependant, la consommation de viande bovine, stable depuis 1998, a diminué de 20% depuis 1985 en France comme dans les pays industrialisés. Elle est passée de 58 à 46 g par jour et par personne au cours des dix dernières années (Source : https://www.credoc.fr) **(Figure 4)**. Selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), cette évolution reflète celles observées en Europe et en Amérique du Nord, mais pas dans les pays asiatiques où la consommation de viande par habitant, qui était relativement faible, est actuellement en forte augmentation. Selon les estimations, la consommation de viande bovine augmentera progressivement à l'horizon 2026 avec 6% d'augmentation pour les pays développés, 17% pour les pays en voie de développement. Elle pourrait même atteindre 44% dans les pays asiatiques qui ont une perception que les viandes bovine et ovine sont plus saines et non porteuses de maladies. La diminution régulière de la consommation de la viande bovine dans les pays développés peut s'expliquer par les crises sanitaires et par les modifications des habitudes alimentaires des consommateurs qui privilégient aujourd'hui les produits transformés (plats tout prêts, sandwichs, pizza…) aux produits frais. De plus, la compétition des viandes de monogastriques (porc et surtout volailles), pour lesquelles les prix sont plus attractifs pour le consommateur, au détriment de la filière bovine (bœuf, veau) peut également expliquer cette diminution. Toutefois avec le steak haché dont la consommation ne fait qu'augmenter, la consommation de bœuf se stabilise Enfin, l'insatisfaction que ressent le consommateur face à la grande variabilité non maîtrisée des qualités organoleptiques de la viande bovine n'est pas non plus sans conséquence sur la consommation. Ainsi, la maîtrise de la qualité de la viande bovine et plus particulièrement de ses qualités sensorielles (tendreté, flaveur, jutosité et couleur) est d'une importance majeure pour la filière bovine. Selon la filière bovine française, 75% de la viande consommée en France est d'origine française (source : http://www.interbev.fr/). À l'écoute de ses consommateurs, de plus en plus soucieux de l'origine des produits mais aussi de la qualité de ces derniers, la France a développé l'utilisation des signes officiels d'identification de qualité et/ou d'origine (AOP, AOC, IGP, Label, BIO) afin de valoriser les produits nationaux et régionaux fabriqués sur notre territoire.

Parmi les qualités sensorielles, la tendreté est la principale qualité recherchée par le consommateur. La variabilité de la tendreté est influencée par de nombreux facteurs liés à l'animal lui-même, à son mode d'élevage et aux facteurs technologiques *post-mortem* des modifications des caractéristiques biologiques du muscle [Picard and Kondjoyan, 2019]. Cependant, moins d'un tiers à un quart de la variabilité de la tendreté peut être expliqué par la variabilité des caractéristiques des animaux vivants [Renand et al., 2001], ce qui suggère l'implication d'autres facteurs dans le déterminisme de la tendreté. L'utilisation de

marqueurs biologiques de qualité de la viande bovine permettrait de mieux orienter la valorisation des animaux de boucherie et d'optimiser les conditions d'élevage. Les caractéristiques musculaires sont sous le contrôle de l'expression de nombreux gènes. Ainsi, la génomique fonctionnelle, notamment au travers de l'utilisation de technologies haut-débit, a offert de nouvelles opportunités pour l'identification de protéines associées aux qualités sensorielles de la viande bovine. Cette stratégie haut débit permet d'avoir une meilleure caractérisation des mécanismes impliqués dans le déterminisme multifactoriel des qualités sensorielles, et notamment la tendreté. Depuis plus de quinze ans, la caractérisation et la prédiction des qualités des viandes est basée sur une démarche innovante d'utilisation de protéines biomarqueurs de qualités sensorielles [Picard et al., 2015b]. Cette recherche de biomarqueurs a été principalement réalisée à partir de prélèvements de muscles par des méthodologies principalement basées sur des méthodes électrophorétiques mono- et bi-dimensionnelles sur gel. Des techniques innovantes de laboratoire, notamment la spectrométrie de masse, sont utilisées dans le domaine médical depuis de nombreuses années. Cette méthode analytique haut-débit, basée sur l'utilisation d'un analyseur haute résolution, est une grande opportunité d'obtenir des listes plus exhaustives de biomarqueurs de tendreté. Comme en biologie humaine, ces techniques peuvent être utilisées pour l'analyse de différents types d'échantillons ou fluides (ex : sang, plasma). Ainsi, elles pourraient permettre d'identifier de nouveaux marqueurs de tendreté susceptibles d'être recherchés de façon non-invasive dans le plasma. De plus, cette stratégie permettrait d'effectuer la détection et/ou quantification de biomarqueurs plus précocement, du vivant de l'animal, et de manière moins invasive qu'une biopsie musculaire. Aussi, au vu des observations rapportées par certaines études indiquant que certains biomarqueurs sont inversement corrélés à la tendreté en fonction du type de muscle étudié [Picard et al., 2014], cette stratégie de recherche de biomarqueurs à partir du plasma pourrait permettre l'identification de potentiel biomarqueurs génériques. En termes scientifiques, les résultats obtenus dans ce contexte seraient tout à fait innovants et porteurs pour la filière. En effet, cette dernière est en attente d'outils permettant une sélection qualitative des carcasses, une meilleure gestion de la commercialisation de ces dernières et montre un intérêt particulier à détenir des outils permettant l'évaluation et/ou prédire le potentiel « qualité » des animaux de leur vivant.

Afin de répondre à ces attentes, la première partie de ce manuscrit sera consacrée à la synthèse des connaissances actuelles relatives à : (i) la transformation du muscle en viande et à la mise en place de la tendreté ; (ii) une revue non-exhaustive des biomarqueurs et voies biologiques identifiés à ce jour comme associés avec la tendreté de la viande bovine ; (iii) un état de l'art au vu de la stratégie retenue pour

découvrir des biomarqueurs plasmatiques de la tendreté de la viande bovine. Les principaux résultats obtenus au cours de mes travaux de thèse seront présentés au travers d'articles scientifiques que j'ai rédigés. Les travaux complémentaires ayant permis d'enrichir ces résultats seront également présentés. Enfin une discussion générale prenant en compte l'ensemble des résultats obtenus tout au long de mes travaux sera proposée à la fin de ce manuscrit.

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : « Du muscle à la viande… »

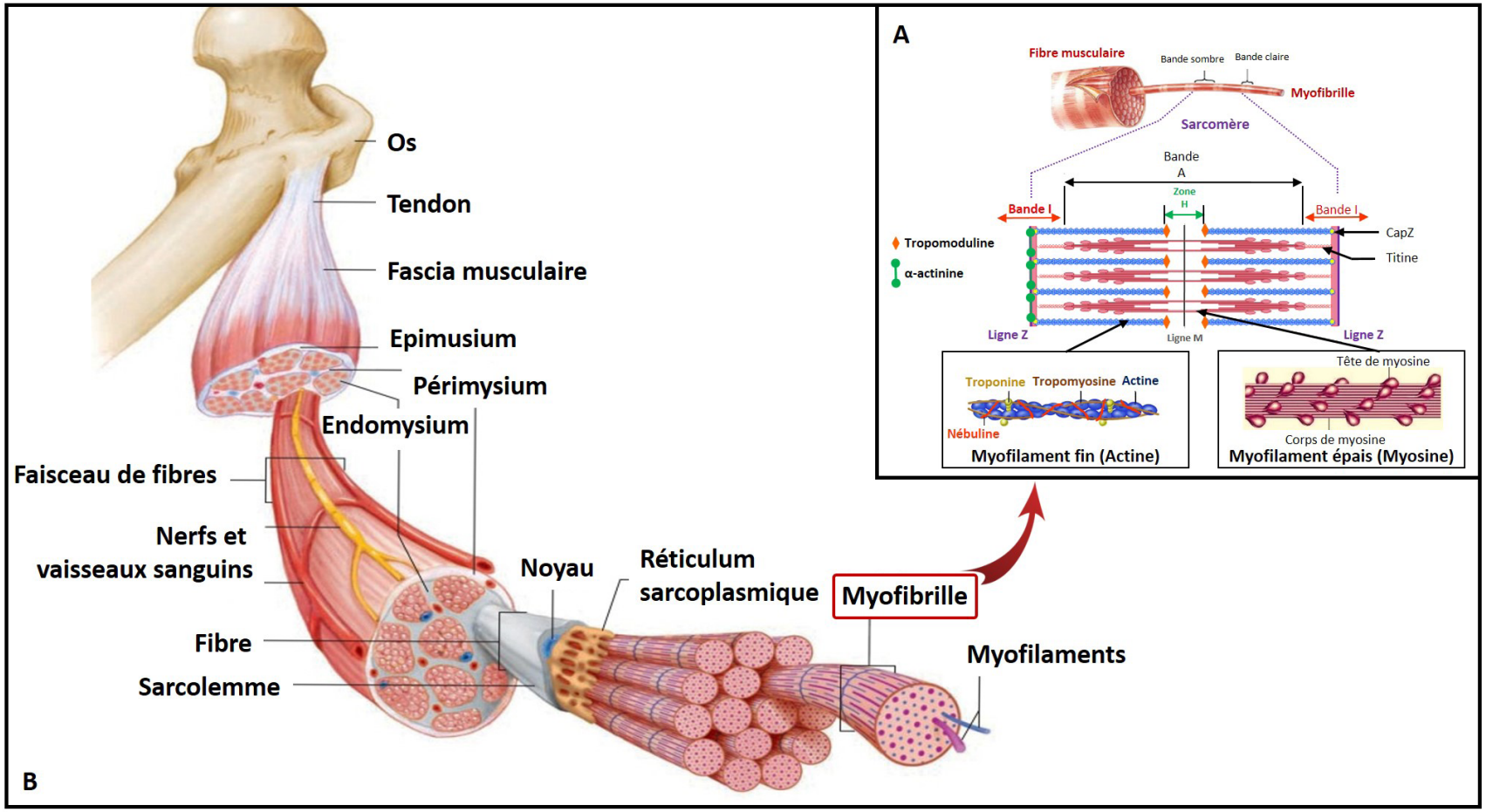


Figure 5. Organisation structurale du muscle strié squelettique

A : Ultrastructure de la fibre musculaire (haut), d'un sarcomère (milieu) et des myofilaments d'actine et de myosine (bas)

B : Organisation anatomique du muscle strié squelettique.

Chapitre 1 : « Du muscle à la viande… »

D'un point de vue structural et physiologique, trois types de muscles sont distingués chez les animaux de rente : les muscles lisses qui constituent la paroi des organes creux (vaisseaux sanguins, tractus gastro-intestinal, parois utérines ou parois des voies respiratoires) ; le muscle cardiaque spécialisé pour générer les contractions rythmiques et automatiques du cœur. Ces deux types de muscles sont sous le contrôle du système nerveux autonome. Le muscle strié squelettique (ou muscle squelettique), sous contrôle volontaire du système nerveux central, présente quant à lui des fonctions uniques qui seront détaillées au cours de ce manuscrit. Constituant près de 40% du poids corporel, le muscle squelettique représente la principale source de viande de la carcasse chez les animaux de rente. Les paragraphes suivants traiteront de ce « tissu noble » ainsi que du déterminisme de sa qualité.

I. Le tissu musculaire squelettique : un tissu composite

Les **muscles squelettiques** ont pour fonction de produire de la force et du mouvement et jouent ainsi ont un rôle fondamental dans l'organisme. Ils sont principalement responsables du maintien de la posture et permettent la locomotion par l'intermédiaire d'un mécanisme moléculaire utilisant de l'énergie : la contraction musculaire. Ils assurent également le maintien de la température corporelle.

Chez l'animal adulte, le muscle squelettique présente une composition relativement constante. Il est essentiellement composé d'eau (75%), de protéines (20%), de lipides (3%), de glucides (1%,) et de sels minéraux (1%) [Smulders et al., 2014; Listrat et al., 2016].

1. Les fibres musculaires

L'activité contractile du muscle est assurée par les myofibrilles, elles-mêmes constituées de myofilaments. Les **myofibrilles** occupent 80% du volume de la fibre musculaire et sont en suspension dans une matrice appelée **sarcoplasme** contenant réticulum sarcoplasmique, mitochondries, noyaux et de nombreux tubes membraneux (tubules transverses ou tubules T). Ces tubules, en continuité avec le **sarcolemme**, forment un réseau permettant à l'ensemble des myofibrilles d'une fibre musculaire d'être simultanément stimulées lors de la transmission de la contraction musculaire.

Les myofibrilles sont constituées d'une structure linéaire composée d'une multitude de **sarcomères**, les unités contractiles du muscle **(Figure 5A)**. Responsables de la striation transversale

observée en microscopie optique, le sarcomère est un segment de myofibrille délimité par deux stries Z. Au sein de la myofibrille, les myofilaments observés en microscopie électronique forment une alternance de zones claires (bandes I) et de zones foncées (bandes A) traduisant l'existence de deux sortes de myofilaments : les myofilaments fins constitués principalement d'actine et les filaments épais constitués de myosine. 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 zone H correspond à la partie du sarcomère qui ne renferme que les filaments de myosine. La partie centrale de la bande A constituant la ligne M se caractérise par un épaississement des filaments de myosine [Astruc, 2014; Listrat et al., 2015].

La myosine et l'actine sont les protéines myofibrillaires majoritaires respectivement des filaments épais et fins mais ne ce ne sont pas les seules protéines à constituer les myofilaments. La myosine, qui représente à elle seule 50% des protéines myofibrillaires, est une protéine dimérique (environ 470 kDa) composée de 2 chaînes lourdes de structure fibreuse (Myosin Heavy Chain (MyHC), PM 200 kDa) qui se terminent par des têtes globuleuses auxquelles sont associées 4 chaînes légères (Myosin Light Chain (MyLC), PM compris entre 16 et 18 kDa). Ces différentes chaînes jouent un rôle majeur dans la contraction musculaire, existent sous différentes isoformes, et contribuent à définir les principaux types de fibres musculaires que nous aborderons par la suite. Les myofilaments épais sont également constitués de protéines de régulation capables de s'associer aux myofilaments afin de maintenir l'alignement du sarcomère durant la contraction musculaire. Ainsi, l'épaisseur du filament épais de myosine est régulée par les MyBP (Myosin Binding Protein) qui se fixent sur les myofilaments de myosine lors leur formation, la longueur du filament étant régulée par la titine (encore appelée connectine). Cette protéine géante de 3000 kDa, présente une extrémité N-terminale fixée sur le disque Z et une extrémité C-terminale ancrée sur la ligne M, ce qui lui permet de maintenir l'alignement du sarcomère durant la contraction musculaire. L'Adénosine monophosphate déaminase (AMP-déaminase), capable de se fixer sur les chaînes lourdes de myosine ainsi que sur la titine, est impliquée dans les changements métaboliques du muscle, dont la régulation est importante au bon fonctionnement musculaire.

Par ailleurs, les myofilaments fins sont des structures dynamiques soumises à des phénomènes d'association/dissociation de fibres d'actine polymérisées en double hélice [Clark et al., 2002]. La dynamique d'addition/perte de fibres d'actine, plus importante à l'extrémité du filament (côté disque Z), est régulée par protéine CapZ. Cette dynamique, moins importante à l'autre extrémité du filament (côté

ligne M), est régulée par la tropomoduline. La régulation de cette dynamique est essentielle au maintien d'une longueur uniforme du filament fin. D'autres protéines telles que la nébuline impliquée dans la régulation de la taille des filaments d'actine ou la tropomyosine et la troponine impliquées dans les interactions actine/myosine sont nécessaires au maintien de la structure du sarcomère [Bottinelli and Reggiani, 2000].

D'autres protéines régulatrices telles que les α-actines, la desmine impliquées dans la liaison des filaments fins au niveau des stries Z, la protéine M ou la myomésine constituant la bande M du sarcomère, ou la protéine C, favorisent les liaisons entre l'actine et la myosine.

2. Le tissu conjonctif

Le tissu conjonctif, composé d'une matrice extra cellulaire (MEC) et de cellules (fibroblastes, adipocytes...etc.) est réparti selon trois enveloppes : l'***endomysium*** qui entoure les fibres musculaires, le ***périmysium*** qui délimite les faisceaux de fibres, et l'***épimysium*** qui est l'enveloppe externe du muscle **(Figure 5B)**. Cette dernière se densifie aux extrémités du muscle pour constituer les tendons. Ces derniers assurent la liaison avec le squelette et constituent le relais de la force motrice développée par le muscle.

La MEC est constituée majoritairement de molécules des familles des collagènes et des protéoglycanes. L'ensemble de ces molécules interagissent entre elles pour générer un réseau complexe qui va lui-même interagir avec les fibres musculaires [Astruc, 2014; Listrat et al., 2015; Nishimura, 2015]. **Les collagènes** constituent une famille de glycoprotéines qui se caractérisent par une structure en triple hélice polypeptidique, appelée tropocollagène. Les molécules de tropocollagène s'assemblent entre elles par des liaisons covalentes pour former des fibrilles. Le collagène comporte également des acides aminés modifiés qui participent au pontage (liaisons de réticulation ou « Cross-Links ») entre les triples hélices de tropocollagène. Ces pontages assurent la force et la flexibilité des fibres mais confèrent une certaine rigidité mécanique à la structure. Leur richesse en acides aminés hydrophobes rend les cross-links insolubles dans l'eau [Dubost et al., 2013]. Le collagène représente environ 80% du poids du tissu conjonctif et se présente sous au moins 21 isoformes. La proportion respective de chacune de ces isoformes dépend du muscle, de l'âge de l'animal, de son type génétique, mais aussi de sa localisation dans de le muscle. Les collagènes de type I, II et III se présentent sous forme fibreuse. Le collagène de type I est retrouvé dans toutes les structures conjonctives (peau, os, tendons). Le collagène de type II est principalement retrouvé dans le tissu cartilagineux. Le collagène de type III est majoritairement présent

dans le *périmysium*, et souvent associé au collagène de type I afin de permettre la transmission de la force des myofibrilles aux tendons des muscles squelettiques. Chez les mammifères, les collagènes fibrillaires de type I et III sont majoritaires [Bailey and Light, 1989]. Les **protéoglycanes** (PGs) sont des molécules complexes et multifonctionnelles capables de se lier à plusieurs dizaines de chaînes de GlycosAminoGlycanes (GAGs) [Dubost et al., 2013; Listrat et al., 2015]. Les PGs forment ainsi de grands complexes en se liant à d'autres PGs mais aussi à des protéines fibreuses de la MEC telles que les collagènes. Ils lient également les cations (Na^+, K^+, Ca^{2+}...), l'eau et régulent les mouvements de molécules au sein de la matrice [Praillet et al., 1998].

Enfin, le muscle est un tissu richement vascularisé et innervé par des fibres sensitives et motrices nécessaires pour véhiculer l'information entre le muscle et le Système Nerveux Central afin de générer et contrôler la contraction musculaire [Brandebourg, 2013; Smulders et al., 2014; Listrat et al., 2015]. Le système artériel permet d'alimenter le muscle en dioxygène et en nutriments qu'il puise dans le sang (glucose, acides gras, acides aminés…), alors que le système veineux permet de dissiper la chaleur et d'éliminer les déchets (dioxyde de carbone, acide lactique) produits à l'issue de la contraction musculaire.

3. Le tissu adipeux et les lipides intramusculaires

Le tissu adipeux est un tissu de stockage d'énergie permettant d'assurer un équilibre entre les besoins et les apports chez de nombreux animaux. Il représente que 4-7% du poids de l'animal à la naissance et entre 7-35% à l'âge adulte en fonction des races bovines [Robelin and Casteilla, 1990; Bonnet et al., 2010; Gotoh et al., 2009]. Chez les animaux producteurs de viande, le TA présente un intérêt particulier car il détermine en partie la valeur commerciale de la carcasse, mais aussi la qualité de la viande [Robelin and Casteilla, 1990]. Le tissu adipeux est constitué de cellules, les adipocytes, dont la particularité principale est de stocker des lipides et de les restituer. Les lipides du muscle sont essentiellement des lipides de structure (phospholipides) et des lipides de réserve (triglycérides et cholestérol) [Huff Lonergan et al., 2010].

La composition lipidique du muscle est très variable et influence les qualités gustatives de la viande. Chez le bovin, au sein du muscle *Longissimus thoracis* (LT), la teneur en Lipides Intra Musculaire (LIM) peut varier de 0,6 à 23,3% du poids frais respectivement entre des bovins Blanc-Bleu-Belge et Noir Japonais abattus à l'âge de 24 mois [Gotoh et al., 2009]. Une analyse inter-race a permis de montrer que la teneur en LIM était plus élevée chez les races Aberdeen Angus, Limousine comparativement aux animaux Blanc-Bleu-Belge [Cuvelier et al., 2006]. D'une façon générale, la quantité et la nature des lipides

déposés dans le muscle dépendent en grande partie des apports alimentaires, de la digestion, de l'absorption intestinale, du métabolisme hépatique et des systèmes de transport des lipides jusqu'au muscle. Enfin, pour les races bovines françaises, la sélection génétique des dernières décennies a permis d'améliorer les qualités des carcasses des races à viande comparativement aux races rustiques et laitières. En effet, la sélection sur la masse musculaire a permis de diminuer les teneurs en lipides et en collagène. Ainsi, les principales races à viande (Charolaise, Limousine et Blonde d'Aquitaine) ont des teneurs en lipides inférieures aux races rustiques telles que l'Aubrac ou la Salers qui ont elles-mêmes des teneurs en lipides inférieures aux races laitières [Bauchart et Gandemer, 2010].

Le muscle squelettique est donc une structure très complexe au niveau cellulaire. Nous verrons dans la suite de ce manuscrit que cette complexité intervient dans les processus d'évolution post-mortem du muscle en viande mais aussi sur la qualité de cette dernière.

II. Des propriétés contractiles et métaboliques particulières

D'un point de vue fonctionnel, les tissus musculaires striés présentent des propriétés essentielles listées ci-dessous [Biga et al., 2020] :

• **L'excitabilité** en réponse à un stimulus de nature chimique (modification locale du pH, libération d'un neurotransmetteur par une cellule nerveuse). En réponse à ce stimulus, la production et la propagation d'une impulsion électrique (ou potentiel d'action) conduira à une contraction musculaire.

• **La contractilité** fait référence à la propriété du tissu musculaire à se contracter en présence de la stimulation appropriée. Il change ainsi de forme, se raccourcit, puis retrouve sa forme initiale tout en mobilisant les éléments osseux auxquels ses fibres sont rattachées. Ceci se fait grâce à l'interaction de deux principales protéines contractiles citées plus haut : l'actine et la myosine.

• **L'extensibilité** qui correspond à la capacité qu'ont les fibres musculaires à se raccourcir lors de la contraction, et à s'étirer au-delà de leur longueur de repos lorsqu'elles sont relâchées. Les fibres musculaires présentent également la particularité de pouvoir reprendre leur longueur de repos dès lorsqu'elles sont relâchées, ce qui leur confère une fonction d'**élasticité**.

• **La tonicité**, c'est à dire l'état de tension minimum nécessaire au maintien de la posture, de l'équilibre et de la vasomotricité des artérioles.

Caractéristiques	Fibres de type I	Fibres de type IIA	Fibres de type IIX
Caractéristiques fonctionnelles			
Vitesse de contraction	Lente	Rapide	Rapide
Force de contraction	Faible	Elevée	Elevée
Caractéristiques structurales			
Couleur	Rouge	Rouge (rose)	Blanche (pâle)
Diamètres des fibres	Petit	Intermédiaire	Grand
Mitochondries	Nombreuses	Nombreuses	Peu nombreuses
Réticulum sarcoplasmique	Petit	Grand	Grand
Vascularisation	Forte	Forte	Faible
Caractéristiques métaboliques			
Teneur en myoglobine	Elevée	Elevée	Faible
Voie de synthèse de l'ATP	Aérobie	Aérobie	Anaérobie
Pouvoir oxydatif	Elevé	Elevé	Faible
Réserves de glycogène	Faibles	Intermédiaires	Elevées
Activité glycolytique	Faible	Elevée	Elevée
Résistance à la fatigue	Elevée	Intermédiaire	Faible

Tableau 1. Caractéristiques fonctionnelles, structurales et métaboliques des fibres musculaires du bovin

Les caractéristiques de la myosine IIB sont semblables à celles de la myosine IIX. Les fibres de type rapide glycolytique IIB, exprimant la myosine IIb, identifiées chez les rongeurs et le porc, ont été identifiées dans le muscle extra-oculaire chez le bovin [Maccatrozzo et al., 2004]. Elles ont été identifiées plus récemment dans les différents types de muscles de bovin mais avec une fréquence d'observation variable selon la race considérée [Picard and Cassar-Malek, 2009].

Adapté de [Picard et al., 2002]

1. Les propriétés contractiles

Comme nous l'avons vu précédemment, les principales protéines myofibrillaires sont l'actine et la myosine. La myosine présente deux propriétés importantes pour la contraction : (i) une propriété ATPasique (au niveau des têtes des chaînes lourdes) qui est activée par les ions calcium (Ca^{2+}), (ii) elle est aussi capable de se lier à l'actine (protéines globulaire, 43 kDa, 376 acides aminés) pour former un complexe : l'**actomyosine**. Il existe plusieurs isoformes de chaînes lourdes de myosine (MyHC) qui permettent de déterminer le type de fibre parmi les types lents oxydatives (fibre I), rapides oxydo-glycolytiques (fibre IIA) ou rapides glycolytiques (fibres IIB et IIX) **(Tableau 1)**. Le type de fibres musculaires a la capacité d'évoluer selon le schéma de plasticité I ↔ IIA ↔ IIX ↔ IIB. Les fibres de type rapide (IIB) ont été initialement identifiées chez les rongeurs et le porc. Chez les espèces de grande taille telles que le cheval, le bovin et l'humain, la MyHC-IIb ne serait pas exprimée (présence d'un pseudo-gène) [Chikuni et al., 2004]. Toutefois, chez le bovin [Maccatrozzo et al., 2004] ont observé son expression dans le muscle extra-oculaire. [Picard and Cassar-Malek, 2009] ont montré la présence de transcrits codant la MyHC-IIb dans les différents types de muscles de bovin, mais la fréquence d'observation de la protéine associée est variable selon la race considérée (25% dans Blonde d'Aquitaine, 6% dans Charolais et 41% dans Limousin) [Picard et al., 2009].

L'interaction actine/myosine formant le complexe actomyosine, est hautement régulée pour prévenir les contractions musculaires indésirables. Sous l'influence du Système Nerveux Central, la stimulation nerveuse des cellules musculaires entraine une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} qui représente le signal de contraction [Gordon et al., 2000]. La dépendance de la contraction des muscles squelettiques à l'égard des ions Ca^{2+} est entièrement liée à une catégorie de protéines accessoires étroitement associées aux filaments d'actine **(Figure 6)** : la troponine (18 kDa) qui fixe le Ca^{2+} et la tropomyosine (35 kDa) qui est constituée de deux chaînes protéiques enroulées autour du filament d'actine et qui est capable de masquer ou démasquer le site de liaison actine/myosine. La troponine est une protéine formée de trois sous-unités : (i) la troponine I (TnI) qui se lie à l'actine et inhibe l'interaction actine-myosine, (ii) la troponine T (TnT) qui se fixe à la tropomyosine et stabilise le complexe troponine-tropomyosine-actine, et (iii) la Troponine C (TnC) qui se lie aux ions Ca^{2+} lors de la contraction musculaire et régule l'inhibition exercée par la TnI [Gordon et al., 2000]. Au repos, en absence de Ca^{2+}, la tropomyosine empêche la tête de myosine d'interagir avec les filaments d'actine. Lorsque la stimulation nerveuse se propage aux triades par les tubules T (situés aux extrémités des filaments épais),

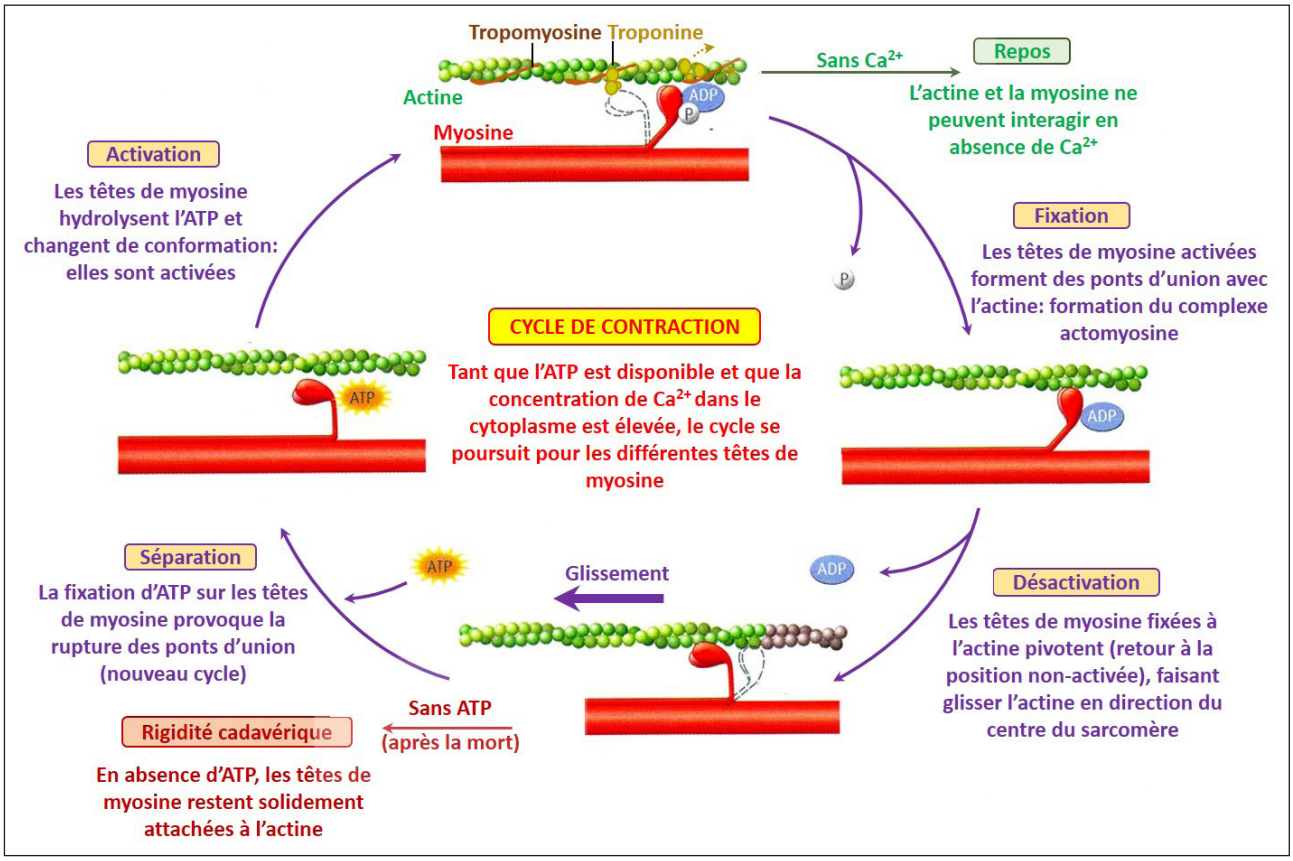


Figure 6. Schématisation du mécanisme de la contraction musculaire

Le mécanisme de contraction se déroule en 4 étapes et nécessite l'hydrolyse de l'ATP et la présence de calcium. La Troponine ne démasque les sites de fixation de la myosine sur l'actine qu'en présence de calcium (Ca^{2+}). Une fois la tropomyosine déplacée avec le complexe troponine, la myosine accède à son site de fixation sur l'actine. L'hydrolyse d'une molécule d'ATP permet le relâchement de la tête de myosine qui vient s'associer avec l'actine. La libération de l'ADP provoque le mouvement de la tête de myosine vers l'extérieur du sarcomère, ce qui raccourcit la myofibrille et réalise la contraction musculaire. Au repos, la myosine est liée à une molécule d'ATP. L'ATP est nécessaire à la rupture du complexe actine/myosine pour permettre un nouveau cycle. Sans ATP, ce complexe actine/myosine reste solidement attaché ce qui engendre la rigidité cadavérique après la mort.

Adapté du site www.biology.berkeley.edu

les canaux Ca^{2+} du reticulum sarcoplasmique s'ouvrent et libèrent le Ca^{2+} dans l'espace intracellulaire. Lorsque la concentration intracellulaire de Ca^{2+} augmente, et sous influence de la troponine, la tropomyosine se déplace légèrement, permettant ainsi l'interaction entre l'actine et la myosine qui se traduit par la contraction musculaire. Une fois la troponine libérée du Ca^{2+}, la troponine et la tropomyosine retrouvent leur conformation originale avec leurs sites de liaison actine/myosine, empêchant ainsi un cycle de contraction non contrôlé.

2. Les propriétés métaboliques

La contraction musculaire fait intervenir l'ATP, la molécule énergétique du muscle, pour rompre le complexe actomyosine, mais également pour stopper l'action des ions Ca^{2+} **(Figure 6)**. La fibre musculaire a donc besoin de régénérer l'ATP à partir d'ADP pour palier ses dépenses énergétiques importantes. Le glucose est un substrat énergétique essentiel car il va pouvoir être mobilisé par la cellule musculaire pour régénérer des molécules d'ATP par la voie de la glycolyse. La caractérisation du type métabolique des muscles peut être réalisée en fonction du type de fibres : les fibres oxydatives (fibres type I) et les fibres glycolytiques (fibres type II), comme décrit précédemment, mais aussi par les métabolismes énergétiques mises en jeu.

a) La voie glycolytique

La voie glycolytique (ou glycolyse) se déroule dans le cytosol de la fibre musculaire et fait intervenir de nombreuses enzymes telles que l'énolase (ENO), la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), la phosphoglycérate kinase (PGK) ou la phosphoglycérate mutase (PGM) **(Figure 7 et 8A)**. Le glucose, et sa forme de stockage le glycogène, font office de substrat à cette voie métabolique, dite « anaérobie » car elle n'utilise pas d'oxygène. La glycolyse est principalement régulée par la phosphofructokinase (PFK) ou la pyruvate kinase (PK). En contraction rapide (effort soudain), le muscle squelettique fonctionne presque exclusivement avec l'ATP issu de la glycolyse, soit 2 ATP par molécule de glucose [Salway, 2004]. Ce rendement est très faible car le pyruvate produit à l'issue de cette réaction contient encore beaucoup d'énergie. Ce pyruvate sert également de substrat à deux autres voies métaboliques : la production de lactate et la voie oxydative aérobie.

b) La voie anaérobie lactique

Cette voie de fermentation permet l'oxydation anaérobie du NADH régénérant le NAD+. Dans les cellules musculaires, il s'agit d'une fermentation lactique qui se déroule dans le cytosol de la fibre

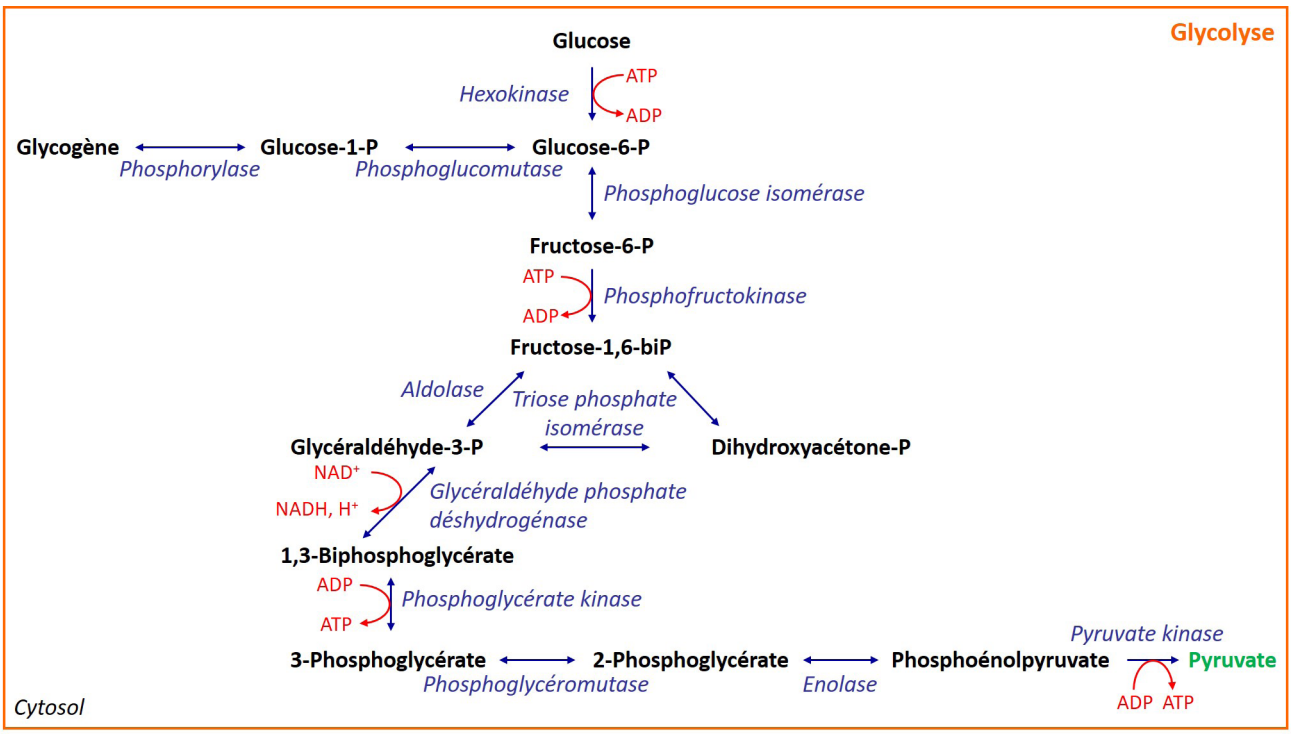


Figure 7. Voie de la glycolyse

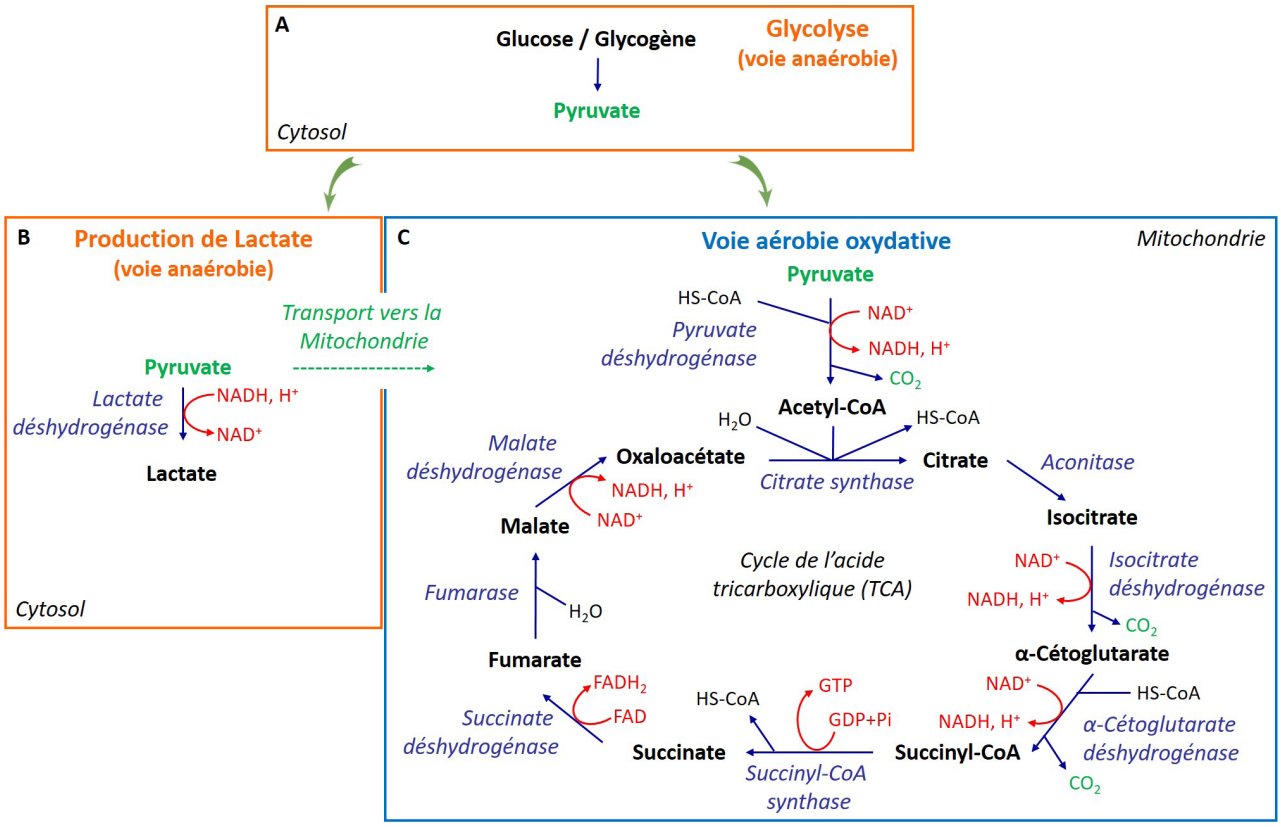


Figure 8. **Intégration de la voie de la glycolyse avec la production de lactate et la voie oxydative**
La voie de la glycolyse (A) et la production de lactate (B) ont lieu dans le cytosol et se déroulent en condition anaérobie. La voie aérobie (C) se déroule dans la mitochondrie.

musculaire **(Figure 8B)**. Cette réaction faisant intervenir la lactate déshydrogénase (LDH) permet de transférer les électrons du NADH vers le pyruvate et ainsi de régénérer le NAD+ tout en générant du lactate. Le lactate n'étant pas utilisable par la fibre musculaire, il s'accumule dans le muscle induisant un signal de fatigue musculaire. Cependant, il a la possibilité de passer dans le sang pour être transporté jusqu'au foie où il pourra être transformé en pyruvate, puis en glucose par la voie de la néoglucogenèse. Le processus du stockage du glucose excédentaire dans le foie (ou dans le muscle) est appelé glycogénogénèse. La coopération entre le muscle et le foie afin d'approvisionner le muscle en glucose exogène venu du foie fait intervenir le cycle de CORI **(Figure 9)**.

c) La voie aérobie oxydative

Le pyruvate a la possibilité d'être transporté dans la mitochondrie où il est oxydé par une voie aérobie faisant intervenir le cycle de l'acide tricarboxylique (ou de Krebs) en présence d'oxygène. De nombreuses enzymes sont impliquées dans ce mécanisme d'oxydation avec notamment la citrate synthase (CS), l'isocitrate déshydrogénase (ICDH), l'α-cétoglutarate déshydrogénase (2-oxoglutarate déshydrogénase ou OGDH), la succinate déshydrogénase (SDH) ou la malate déshydrogénase (MDH) **(Figure 8C)**. Les molécules de $NADH^+$ et $FADH_2$ sont utilisées dans la chaîne respiratoire mitochondriale pour produire de l'énergie au muscle sous forme d'ATP **(Figure 10)**. Pour une molécule de glucose, la voie aérobie permet de produire 36 à 38 molécules d'ATP [Salway, 2004]. Ce rendement, beaucoup plus élevé que la glycolyse permet de produire beaucoup plus d'énergie, mais nécessite plus de temps pour se mettre en place : c'est un atout pour la fibre musculaire lorsqu'elle est soumise à un effort constant et long.

d) Intégration des différentes voies métaboliques

Le métabolisme énergétique de la fibre musculaire ne fait pas intervenir une seule et unique de ces voies. En effet, les différentes voies sont connectées entre elles par leurs substrats et produits communs **(Figure 8)**. Les lipides permettent par exemple à la cellule de produire de l'énergie au travers du cycle des acides gras. Ces différentes voies sont régulées en fonction des besoins et des caractéristiques de la fibre musculaire (présence ou absence d'oxygène, besoins énergétiques…). Une fibre peut ainsi être orientée vers un métabolisme plus glycolytique ou plus oxydatif. Selon leur fonction (muscle de posture à contraction lente mais longue, ou muscle de mouvement à contraction rapide et de courte durée) les muscles, peuvent utiliser strictement le métabolisme glycolytique ou oxydatif, ou les deux métabolismes (muscles mixtes). Les muscles des animaux producteurs de viande sont les précurseurs de pièces

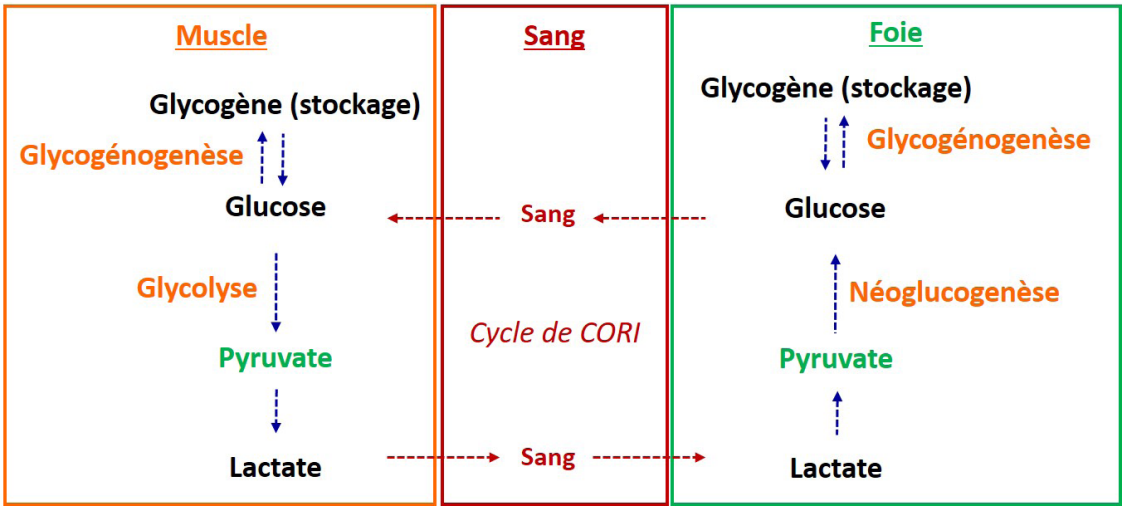


Figure 9. Le cycle de CORI
Cette boucle métabolique permet le recyclage du lactate sanguin au niveau du foie

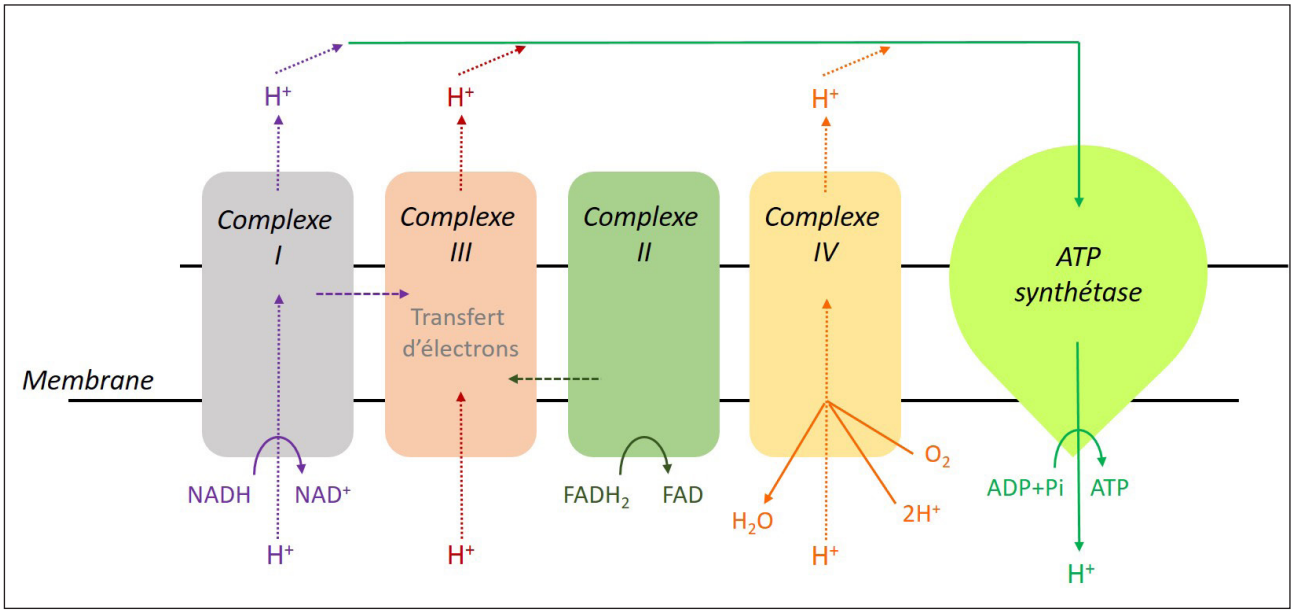


Figure 10. La chaîne respiratoire mitochondriale
Les électrons du NADH, H^+ son captés par le complexe I contenant la NADH déshydrogénase. La succinate déshydrogénase du complexe II réduit le FAD en $FADH_2$. Les électrons sont ensuite transportés au complexe III par le co-enzyme Q. Au cours du cycle du co-enzyme Q, les électrons sont ensuite transférés un à un aux cytochromes du complexe III, puis au cytochrome c. Le cytochrome c est situé sur la face externe de la membrane interne. Elle transporte les électrons au complexe IV qui catalyse la réduction de l'oxygène en deux molécules d'eau. En parallèle au transport des électrons, un gradient électrochimique est établi de part et d'autre de la membrane interne par le pompage de protons au niveau des complexes I, III et IV. Ce gradient constitue une force protomotrice utilisée par l'ATP synthétase pour la production d'ATP.

bouchères d'intérêt économique variable. Selon leur position anatomique et leur fonction, les muscles vont avoir des propriétés contractiles et métaboliques différentes qui vont conditionner le métabolisme *post-mortem* permettant la transformation du muscle en viande. Ainsi, l'ensemble des paramètres décrits tout au long de ce chapitre va contribuer au déterminisme de la qualité finale de la viande.

III. La viande : un produit issu de la transformation *post-mortem* du muscle

La transformation du muscle en viande commence dès la mort de l'animal. Les muscles sont le siège de modifications, plus ou moins importantes, conditionnant les qualités organoleptiques finales de la viande. Cette étape de transformation fait appel à un ensemble de processus très complexes, de nature à la fois enzymatique et physico-chimique (pour revue [Ouali et al., 2013]). Au cours de sa transformation en viande, le muscle passe successivement par trois phases successives **(Figure 11)**.

• **La phase de pantelance** qui débute immédiatement après l'abattage et se caractérise par la persistance des contractions musculaires durant une vingtaine de minutes. Durant cette phase, le système nerveux continue à fonctionner alors que la circulation sanguine générale est arrêtée.

• **La phase de rigidité cadavérique** (ou "*rigor-mortis*") qui suit se caractérise par la mise en place d'un état de rigidification des muscles causé par une série de modifications biochimiques qui s'installent progressivement avec la disparition de la première phase. 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 et al., 1999; Maltin et al., 2003].

• **La phase de maturation** met en jeu différents systèmes protéolytiques endogènes dès la mort de l'animal [Ouali, 1991] et se traduit par des altérations de la structure et de la composition biochimique des muscles : on parle de protéolyse *post-mortem* [Jiang, 1998; Harper et al., 1999]. C'est au cours de cette phase que la tendreté va se mettre en place progressivement. Au cours de la maturation, seuls les protéines et les lipides de la viande sont transformés ; le collagène, autre composant du muscle (tissu conjonctif), n'est pas modifié. Il détermine de la dureté de base de la viande.

Plus récemment, des travaux ont montré l'existence d'une phase supplémentaire induite par l'arrêt de la circulation sanguine qui déclencherait la mort cellulaire programmée avant la phase de *rigor-mortis*. Ce processus précoce d'apoptose jouerait un rôle prépondérant dans la mise en place de la qualité de la viande et en particulier la tendreté [Ouali et al., 2006] **(Figure 11)**.

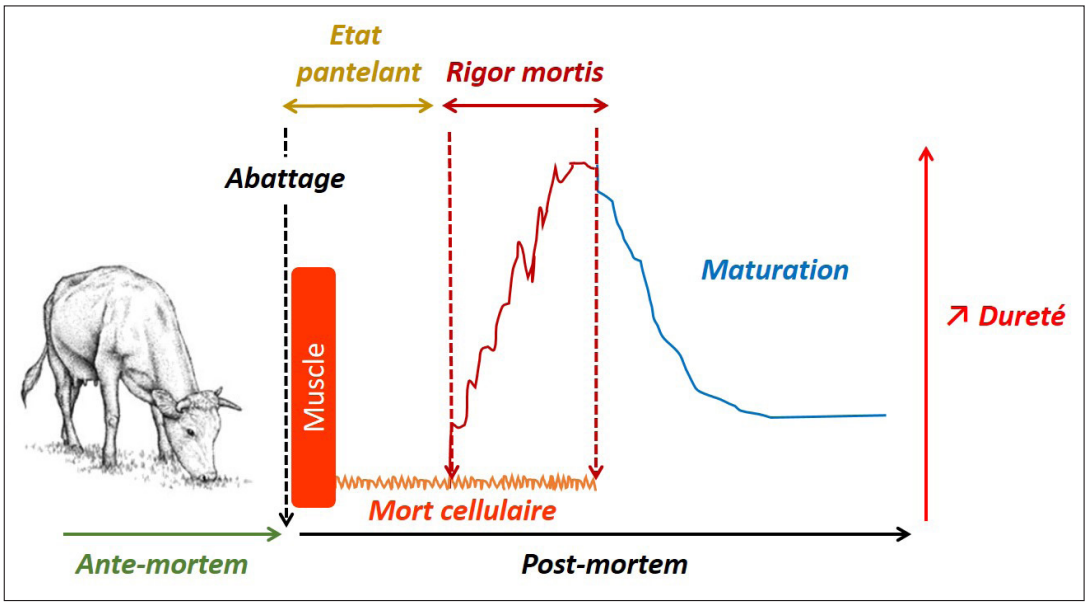


Figure 11. Différentes phases de la transformation du muscle en viande incluant la phase de mort cellulaire programmée.

Adapté de [Ouali, 1991; Ouali et al., 2006] qui propose une étape précoce de mort cellulaire initiée dès le début de la phase post-mortem.

1. Evolution du pH *post-mortem*

Comme nous l'avons vu précédemment, 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 et al., 1999 ; Maltin et al., 2003]. En effet, en raison de l'arrêt de l'apport d'oxygène après l'abattage des animaux, le muscle passe peu à peu d'un métabolisme aérobie vers un métabolisme anaérobie **(Figure 8)** conduisant à la production d'acide lactique jusqu'à l'épuisement des réserves énergétiques (glycogène). 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 ont une très forte incidence sur la qualité finale de la viande [Bendall, 1979]. Après la mort de l'animal, le pH diminue progressivement, puis se stabilise à une valeur appelée « pH ultime » (ou pHu). Une chute trop forte et trop rapide du pH aboutit à un pHu faible (pH< 5), ce qui entraîne une couleur défavorable à l'acte d'achat par le consommateur et à une perte d'eau trop importante [Fischer and Hamm, 1980].

La vitesse de chute du pH *post-mortem* dépend principalement de l'activité ATPasique. Suite à la mort de l'animal, la baisse d'ATP disponible inhibe les ATPases sarcoplasmiques. Ceci provoque une fuite de Ca^{2+} du Réticulum Sarcoplasmique vers le milieu extracellulaire de la fibre musculaire : à forte concentration, le Ca^{2+} induit la formation de complexes actine-myosine avec pour conséquence une contraction musculaire. Cependant, 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 et la rigidité cadavérique s'installe. Dans des conditions optimales d'abattage, au bout de 24h *post-mortem* chez le bovin, le pHu se stabilise à une valeur avoisinant un pHu=5,5 ; les complexes actine-myosine sont majoritaires et tout l'ATP a été consommé : le muscle atteint alors son maximum de dureté. La vitesse de diminution du pH *post-mortem* dépend également de la température à laquelle est placée la carcasse. En effet, cette chute de pH est la résultante d'actions enzymatiques inhibées à basse température [Ouali, 1991].

Le pHu est l'un des indicateurs de la qualité technologique de la viande utilisé en abattoir : il explique une part non négligeable de la variabilité de la tendreté, de la jutosité et de la flaveur de la viande [Bendall, 1979]. La nature de la relation entre pH et tendreté n'est pas encore complètement élucidée, mais un pHu élevé (pHu> 6) produit des viandes à coupe sombre, sèches et impropres à la consommation à cause d'un pH favorable au développement des microorganismes [Newton and Gill, 1981].

Au sein du muscle, l'évolution du pH *post-mortem* est influencée par le type de fibres musculaires. En effet, [Gagaoua et al., 2015d] ont rapporté une corrélation positive entre la valeur du pHu et la

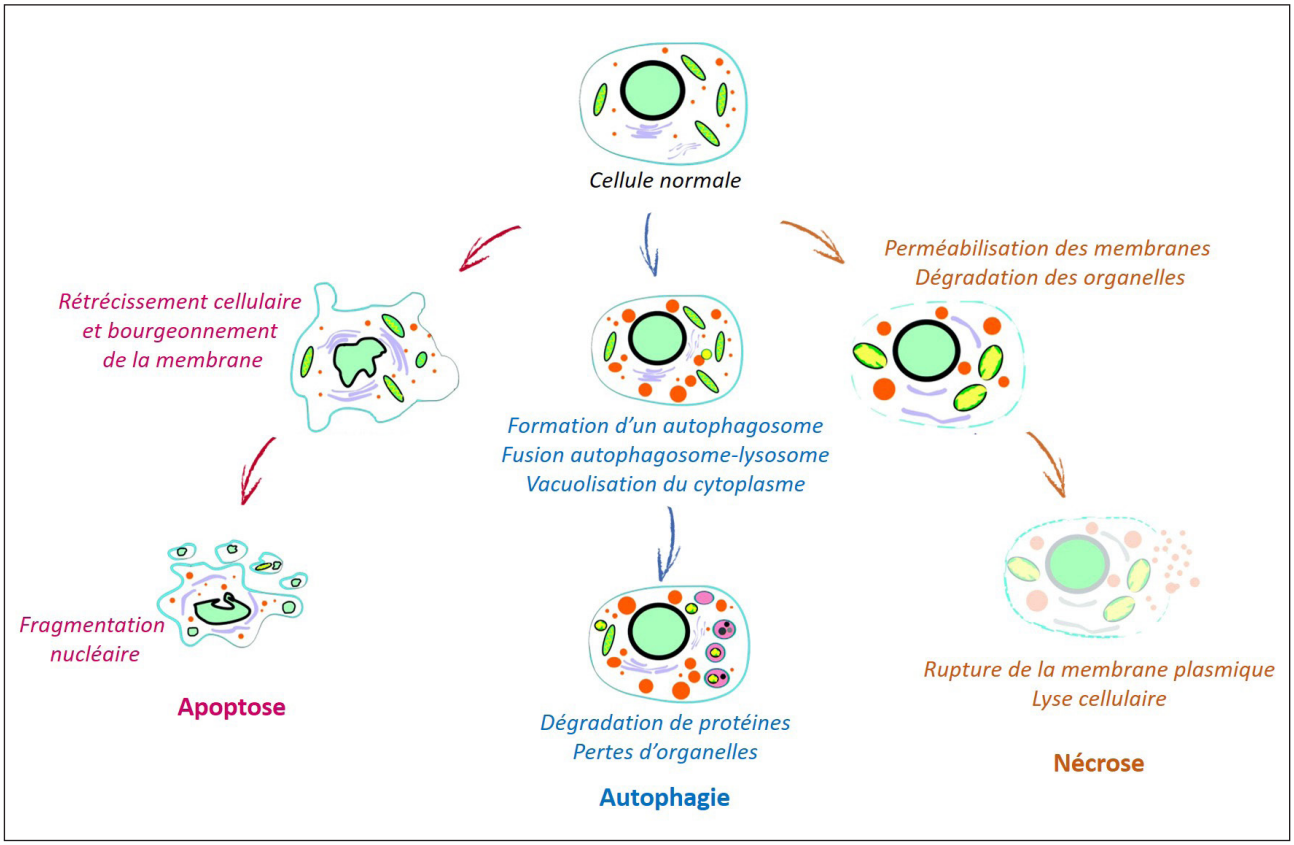


Figure 12. Les trois voies de la mort cellulaire

Selon les types cellulaires et les stimuli, une des voies (apoptose, autophagie ou nécrose) peut être privilégiée. Les caractéristiques morphologiques des trois types de mort cellulaire sont illustrées.

Adapté de [Hotchkiss et al., 2009]

proportion de fibres de type I. Selon [Larzul et al., 1997], la taille des fibres I est corrélée négativement avec la vitesse de la chute de pH dans le muscle *Longissimus* de porc. Aussi, d'autres auteurs ont rapporté qu'une augmentation de la proportion et de la taille des fibres de type rapide-glycolytique entraine une augmentation de la vitesse de chute du pH et une diminution du pHu [Kim et al., 2016a ; Larzul et al., 1997].

La relation curvilinéaire entre le pHu, le type de fibre et la tendreté pourrait également refléter des différences dans l'intensité de la protéolyse au cours de la maturation [Wu et al., 2015 ; Holdstock et al., 2014].

2. L'apoptose ou « mort cellulaire programmée »

Introduit en 1972, le terme d'apoptose ou « mort cellulaire programmée » fait référence à un processus actif et physiologique de mort cellulaire, utilisé pour éliminer les cellules en excès, endommagées ou infectées, cellules qui sont considérées comme potentiellement dangereuses pour l'organisme [Kerr et al., 1972]. L'apoptose est aussi impliquée dans des phénomènes physiologiques, notamment au cours de l'embryogenèse et de la morphogenèse [Allard et al., 2000 ; Wood et al., 2000].

Plus récemment le «Nomenclature Committee on Cell Death » a permis d'uniformiser la terminologie afin de distinguer trois types de mort cellulaire définis par des critères morphologiques, biochimiques et moléculaires spécifiques : l'autophagie associée à la mort cellulaire, la nécrose et l'apoptose **(Figure 12)** [Hotchkiss et al., 2009 ; Kroemer et al., 2009].

• **Le terme autophagie** désigne un processus d'autodigestion de matériel cellulaire par la voie de dégradation lysosomale. Ce mécanisme est notamment déclenché par la cellule pour permettre la survie cellulaire en condition de carence nutritionnelle. Ceci permet à la cellule de se fournir en apport d'acides aminés ou d'acides gras essentiels à la synthèse protéique ou lipidique : c'est son mécanisme de survie. Il existe plusieurs types d'autophagie : (i) la micro-autophagie permettant la séquestration de petites portions de cytoplasme dans les lysosomes par invagination de la membrane lysosomale, (ii) l'autophagie dépendante de protéines chaperonnes qui permettent l'adressage de protéines solubles mal repliées aux lysosomes, (iii) la macro-autophagie, communément appelée autophagie, permettant la dégradation des protéines à durée de vie longue et des organites endommagés [Mizushima et al., 2008]. Une autophagie dérégulée peut également conduire à la mort cellulaire probablement par autoconsommation excessive des constituants vitaux de la cellule. Selon [Levine and Yuan, 2005], l'autophagie servirait de mécanisme

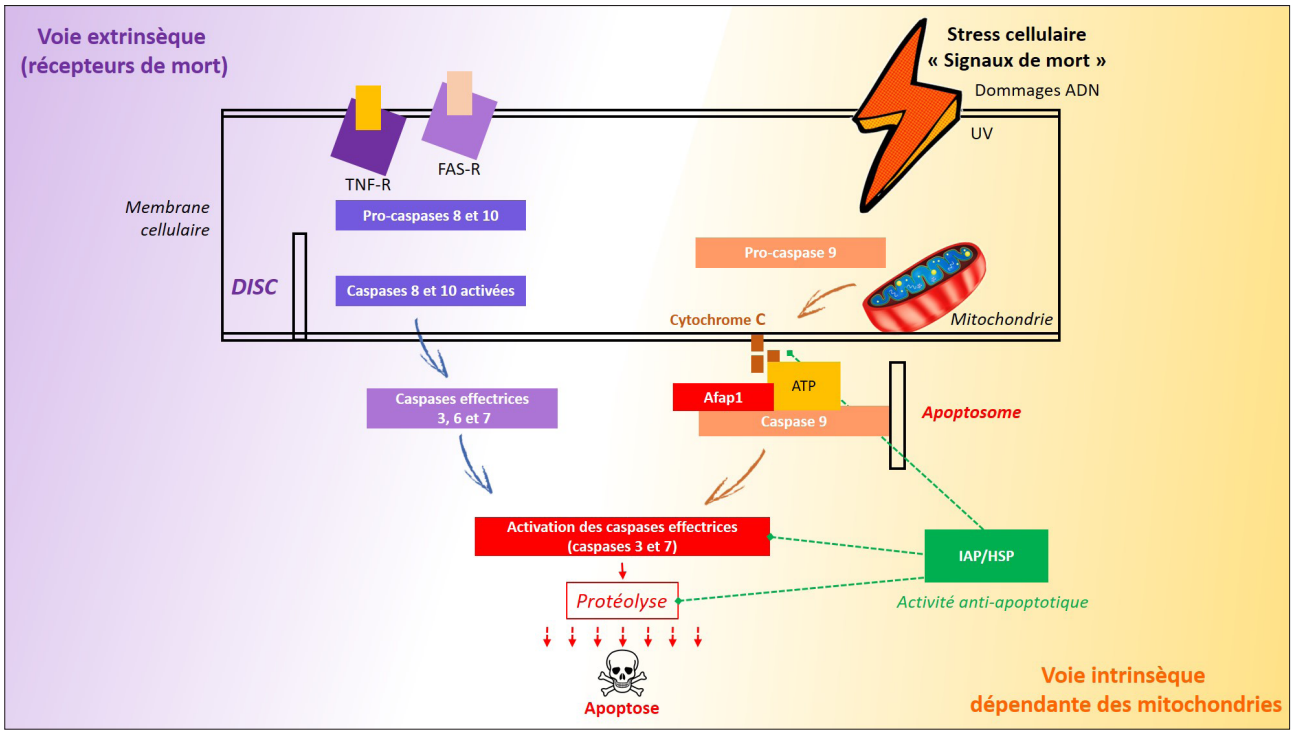


Figure 13. Voies d'activation de l'apoptose par les caspases

L'apoptose peut être initiée par deux voies majeures : une voie intrinsèque (mitochondrie, en orange) et une voie extrinsèque (récepteur de mort, en violet). Dans les deux cas, l'induction de l'apoptose conduit à l'activation d'une caspase initiatrice : la caspase-8 (et éventuellement caspase-10) pour la voie extrinsèque et la caspase-9, activée par la formation de l'apoptosome, pour la voie intrinsèque. La (ou les) caspase(s) initiatrice(s) permet (tent) d'activer les caspases effectrices et ainsi l'apoptose. L'activation de la cascade des caspases peut être régulée par des protéines inhibitrices de l'apoptose (protéines IAP ou HSP) qui sont capables de se lier directement aux caspases en empêchant leur clivage nécessaire à leur activation.

de secours pour induire la mort si l'apoptose est déficiente, c'est la raison pour laquelle on parle de « mort cellulaire associée à l'autophagie » plutôt que de mort par autophagie.

• **Au cours de la nécrose**, mort cellulaire dite « désordonnée », les cellules se gorgent d'eau au point que cela entraîne la lyse de leur membrane, des organites ainsi que de l'ADN nucléaire, conduisant à leur libération dans le milieu environnant. 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 d'initiation de la nécrose, affectant ainsi toute une région tissulaire qui sera détruite [Fidziańska et al., 1991].

• Par opposition à la nécrose, **l'apoptose** est considérée comme une mort cellulaire « ordonnée », au cours de laquelle des protéines spécifiques (notamment les caspases) dégradent la cellule, ainsi que son contenu par des mécanismes particuliers (bourgeonnement de membrane, fragmentation nucléaire…) [Nakanishi et al., 2001; Hotchkiss et al., 2009 ; Kroemer et al., 2009].

3. Les voies biologiques conduisant à l'apoptose

Plusieurs voies conduisant à l'apoptose ont été mises en évidence. Parmi ces voies, nous allons détailler les deux voies majeures : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque. Les deux autres voies dites « mineures », qui font intervenir le reticulum endoplasmique et le granzyme B, ne seront pas décrites ici. Les détails de ces voies mineures sont cependant disponibles au travers de plusieurs revues de synthèse [Dlamini et al., 2004 ; Rupinder et al., 2007; O'Brien and Kirby, 2008].

De façon générale, l'apoptose peut être initiée par deux voies **(Figure 13)** : (i) la voie intrinsèque (ou mitochondriale) en réponse à des « signaux de mort » (ex : exposition aux radiations UV, dommages à l'ADN, action d'antibiotiques ou de protéines suppresseurs de tumeurs telle que la protéine p53…), et (ii) la voie extrinsèque qui est dépendante de l'activation de « récepteurs de mort ». Dans les deux cas, l'induction de l'apoptose conduit à l'activation de caspases initiatrices : la caspase-8 (et éventuellement la caspase-10) pour la voie extrinsèque et la caspase-9 (voie intrinsèque). Pour ces deux voies, l'activation de la cascade des caspases peut être régulée par des protéines inhibitrices de l'apoptose (protéines IAP) qui sont capables de se lier directement aux caspases afin d'empêcher le clivage des caspases nécessaires à leur activation [Fesik and Shi, 2001].

• **La voie intrinsèque mitochondriale** est induite par la cellule elle-même lorsqu'elle n'a pas d'autres solutions que le suicide **(Figure 13)**. Les « signaux de la mort » (UV, dommage de l'ADN…)

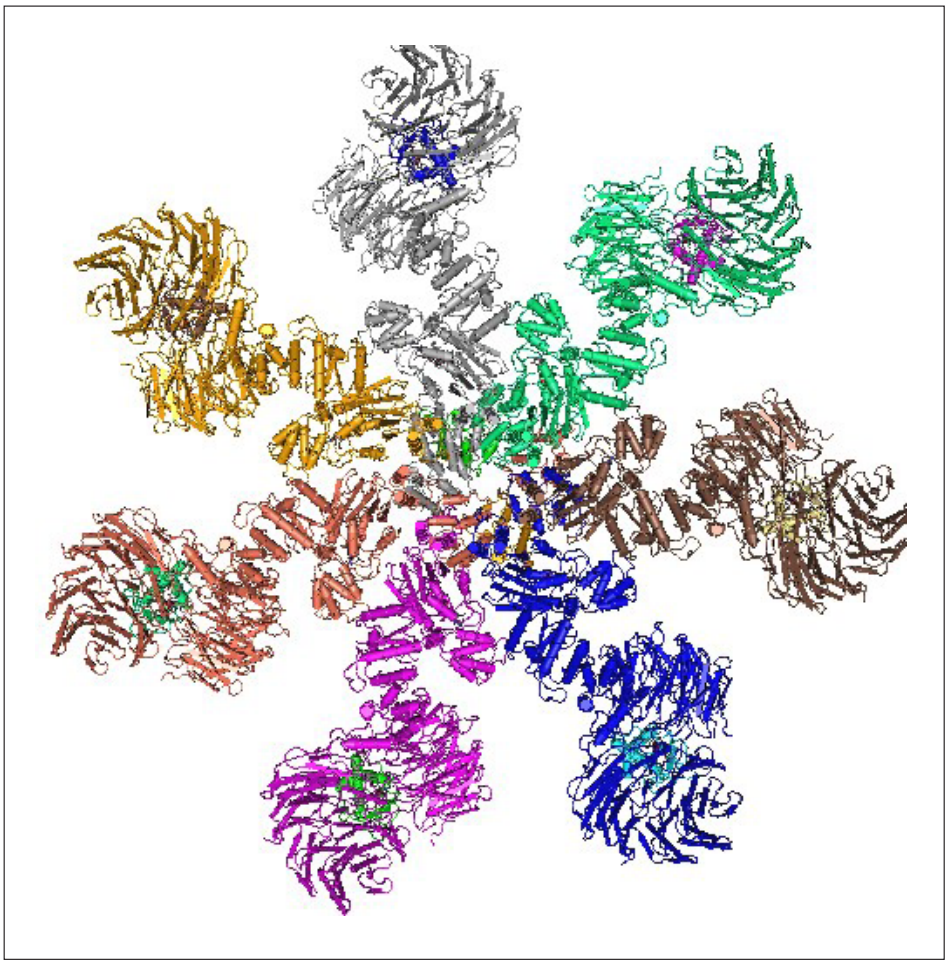


Figure 14. Structure cristallographique de l'apoptosome avec la caspase 9 de *Bos taurus*
Source : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

impliquent une dégradation des mitochondries par des protéines pro-apoptotiques de type BAX qui se fixent au niveau de la membrane mitochondriale [Kroemer and Reed, 2000]. Les mitochondries subissent alors une perte de potentiel de membrane et une perméabilisation de leur membrane externe conduisant à la libération du cytochrome-c dans le cytoplasme (facteur pro-apoptotique) [Aleo et al., 2006 ; Gupta, 2003]. Le cytochrome-c formera un complexe protéique (ou apoptosome, **Figure 14**) en s'associant avec d'autres protéines telles que la protéine Apaf-1 (pour l'anglais « Apoptotic protease activating factor-1 ») ou la caspase 9. L'apoptosome constitue le site d'activation de la caspase-9 qui pourra alors activer les caspases effectrices (caspase-3 et caspase-7) et ainsi l'apoptose [Chowdhury et al., 2006 ; Aleo et al., 2006 ; Gupta, 2003]. Dans la famille des protéines BAX, la protéine BCL2 (facteur anti-apoptotique) tendra à préserver la membrane mitochondriale [Desagher et al., 1999]. Ainsi, le rapport de concentration entre les protéines BAX et BCL2 influencera la vitesse à laquelle le cytochrome-c sera libéré dans le cytoplasme. En condition de stress, des protéines de choc thermiques (HSPs) au rôle anti-apoptotique seront mobilisées et/ou synthétisées. Elles ont la capacité de séquestrer des facteurs pro-apoptotiques tels que le cytochrome c et/ou de former un complexe avec les caspases pour les inhiber. Elles protègent ainsi les protéines cibles en prévenant la dégradation.

- **La voie extrinsèque** implique des récepteurs de mort cellulaire qui appartiennent à la superfamille des récepteurs au Tumor Necrosis Factor (TNF) [Ashkenazi, 2002] **(Figure 13)**. La liaison d'un ligand spécifique sur les « récepteurs de mort » induit la liaison de protéines adaptatrices (ex : FADD pour l'anglais « Fas Associated Death Domain », les pro-caspases initiatrices-8 et -10) qui peuvent être inductrices ou inhibitrices du processus apoptotique. Les 6 « récepteurs de mort » connus à ce jour incluent les récepteurs de tumeur (ou TNF-R pour l'anglais « tumor necrosis factor receptor ») : TNFR-1 (aussi connu comme p55), CD95 (aussi connu comme Fas), DR3 (ou Death-receptor 3), DR4 (aussi connu comme TRAIL-R1), DR5 (ou Apo TRAIL-R2) et DR6 [Ashkenazi, 2002; Yeh et al., 2000; Gupta, 2003]. L'interaction du ligand (ex : TNF-α, CD95L, Apo3L) avec son récepteur spécifique (ex : TNF-F, CD95, DR3) respectivement, conduit à la formation du domaine de mort intracellulaire (ou « Death Domain » DD) qui va pouvoir lier la protéine adaptatrice intracellulaire appelée TRADD (TNF-R Associated Death Domain). TRADD va à son tour s'associer avec la protéine adaptatrice FADD. FADD recrute ensuite la pro-caspase-8 initiatrice pour former le DISC (ou « Death Inducing Signal Complex » [Thorburn, 2004; Philchenkov, 2004]. La caspase-8 ainsi activée, ainsi que la caspase-10, seront en mesure d'activer les caspases effectrices (caspase-3 et caspase-7) et ainsi l'apoptose [Zimmermann et al., 2001; Fuentes-Priors and Salvesen, 2004].

Il existe des interactions entre ces deux voies d'induction de l'apoptose. Par exemple, le clivage de la protéine BID (membre de la famille BCL2) par caspase-8 active la voie mitochondriale après l'induction de l'apoptose par les « récepteurs de mort ». Ce mécanisme est utilisé par la cellule pour amplifier le signal apoptotique [Li et al., 1998].

La contribution de l'apoptose à la mise en place de la tendreté a été proposée en 2006 [Ouali et al., 2006]. L'apoptose constitue une des premières étapes de la maturation (revue de Guillemin et al 2009), mais jouerait également un rôle prépondérant dès la phase de *rigor-mortis* [Guillemin et al., 2009a; Ouali et al., 2006]. Bien que l'implication de l'apoptose dans la tendreté ait été remise en cause par certaines études [Underwood et al., 2008], les travaux de [Kemp and Parr, 2012a] ont mis en évidence le rôle possible des caspases dans l'attendrissage de la viande et ont souligné l'interaction probable entre le système calpaïne/calpastatine et les caspases. D'autres systèmes protéolytiques ont également été montrés comme impliqués dans le processus de maturation [Maltin et al., 2003; Ouali et al., 2006]. Ces systèmes, qui comprennent les métalloprotéases (MMPs), les calpaïnes (calcium dépendant), les cathepsines (protéines lysosomales), les caspases, le protéasome et les protéases à sérine/SERPIN, seront développés dans la suite de ce manuscrit.

IV. Les systèmes protéolytiques *post-mortem* et l'apoptose

4. Le calcium musculaire en *post-mortem*

Comme nous l'avons vu précédemment, l'ion calcium (Ca^{2+}) est indispensable à la contraction musculaire. C'est aussi un acteur indispensable au déclenchement et au déroulement de l'apoptose [Orrenius et al., 2015] et par conséquent un acteur important pour le processus d'attendrissage de la viande. Durant l'installation de la *rigor-mortis*, le Ca^{2+} relargué par le RE entraîne une augmentation du taux de Ca^{2+} dans la cellule musculaire [Vignon et al., 1989]. L'augmentation du taux de Ca^{2+} intracellulaire induit l'apoptose par l'intermédiaire de la voie intrinsèque mitochondriale et l'activation de la voie des caspases [Liu et al., 1996] **(Figure 13)**. Ce phénomène d'apoptose est de plus favorisé par le système des calpaïnes (dépendant du calcium) et par la modification de la perméabilité de la membrane externe des mitochondries qui permet la libération de signaux pro-apoptotiques à l'intérieur de la mitochondrie. En effet, la voie apoptotique intrinsèque favorise l'infiltration de divers solutés (dont de l'eau) dans la mitochondrie. Ceci provoque son gonflement et l'altération de sa membrane externe conduisant à une augmentation de sa perméabilité membranaire. L'augmentation de la perméabilité membranaire

mitochondriale induit l'ouverture de pores calciques de type PTP (Permeability Transition Pore). Ce complexe protéique, localisé au niveau des points de contact entre les membranes mitochondriales internes et externes [Patron et al., 2013], fonctionne comme un canal de transfert moléculaire Ca^{2+}-dépendant. Ces pores permettent aux molécules de faible poids moléculaire, telles que le cytochrome-c, inhibiteurs IAP et autres protéines pro-apoptotiques, d'être relarguées dans le cytosol et de favoriser l'apoptose, ainsi qu'un arrêt du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale [Saelens et al., 2004; Glancy and Balaban, 2012; Orrenius et al., 2015].

5. Le système Ca^{2+} calpaïne/calpastatine

Les **calpaïnes** sont des peptidases à cystéine cytoplasmiques Ca^{2+}-dépendantes qui clivent sélectivement les protéines en réponse à des signaux calciques [Sentandreu et al., 2002]. Elles ont une structure particulière constituée de 2 sous-unités : (i) une sous-unité catalytique de 80 kDa qui possède une activité peptidase spécifique à chaque enzyme, et (ii) une sous-unité régulatrice de 30 kDa commune à toutes les calpaïnes. Les calpaïnes contrôlent les fonctions cellulaires telles que les remodelages cytosquelettiques, la progression du cycle cellulaire mais aussi l'apoptose [Takano et al., 2005; Franco and Huttenlocher, 2005]. Elles existent sous plusieurs isoformes dont principalement la μ-calpaïne et la m-calpaïne qui sont ubiquitaires et retrouvées dans le tissu musculaire : elles sont respectivement actives à des concentrations calciques de l'ordre du μM et mM. L'activité des calpaïnes peut donc être régulée par les ions calcium (Ca^{2+}), les phospholipides ou leurs inhibiteurs spécifiques: les calpastatines [Squier et al., 1994; Goll et al., 2003]. L'activation des calpaïnes s'effectue par la fixation des ions Ca^{2+} au niveau des sous-unités catalytiques et régulatrices, ou par la fixation de phospholipides sur la sous unité catalytique, lui-même sous la dépendance du Ca^{2+}. Les calpaïnes sont également impliquées dans les mécanismes de nécrose et dans les systèmes apoptotiques, car elles sont capables de contrôler l'activité des protéines de régulation apoptotiques [Takano et al., 2005]. Plusieurs inhibiteurs de calpaïnes, en particulier les calpastatines, permettent de prévenir l'apoptose [Squier et al., 1994; Sarin et al., 1994].

Les calpastatines (50-172 kDa, 4 domaines) sont des protéines polymorphes dont l'activité est dépendante du calcium. Elles agissent comme des inhibiteurs compétitifs des calpaïnes en se fixant sur leur sous-unité régulatrice et catalytique. Elles agissent donc comme des inhibiteurs de l'apoptose. Les caspases et les calpaïnes partagent des substrats communs, ce qui suggère leur collaboration conjointe dans l'apoptose [Bizat et al., 2003 ; Wood et al., 1998]. Comme nous allons le voir, le système

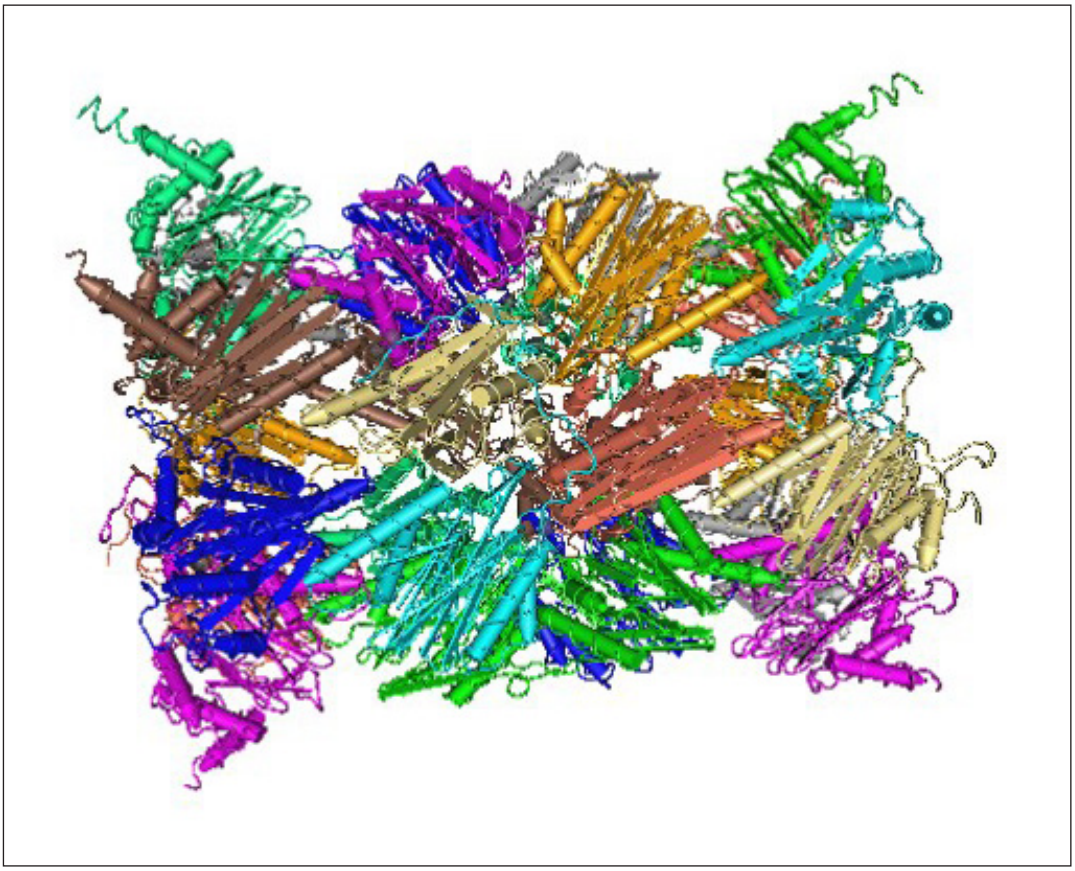


Figure 15. **Structure cristallographique du proteasome 20S de *Bos taurus***
Source : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

calpaïne/calpastatine, ainsi que d'autres systèmes protéolytiques endogènes sont également inducteurs de l'apoptose.

6. Le système lysosomal : les cathepsines

Les **cathepsines** sont des peptidases lysosomales actives à pH acides compris entre 3 et 6,5 [Sentandreu et al., 2002]. Plusieurs grandes familles de cathepsines peuvent être distinguées : (i) les protéases à cystéines (cathepsines B, H et L ...), (ii) les protéases à acide aspartique (cathepsines D et E), et (iii) les protéases à sérine (cathepsine G). L'activité des cathepsines est régulée par le pH, par l'activation de leur précurseur (clivage de la partie N-terminal du pro-peptide) ou par leurs inhibiteurs spécifiques : les **cystatines**. Les cathepsines sont des enzymes intervenant dans les dégradations aspécifiques du lysosome impliquées dans de nombreux processus cellulaires tels que le développement de certains cancers par dégradation de la matrice extra cellulaire (MEC) (cathepsines B, H et L). Elles sont également impliquées dans les processus d'apoptose de par leur capacité à activer d'autres peptidases telles que les caspases. Ceci a été montré dans muscle *post-mortem* où les membranes lysosomales deviennent perméables et permettent la libération du contenu lysosomal, dont la cathepsine D qui joue un rôle crucial dans le développement de la tendreté *post-mortem* impliquant l'apoptose [Zhang et al., 2019].

7. Le système du protéasome : le protéasome 20S

Le système ubiquitine/protéasome, complexe enzymatiques multi-catalytique ATP dépendant représente la voie principale de dégradation des protéines poly-ubiquitinylées chez les eucaryotes. Le cœur catalytique de ce complexe, le **protéasome 20S**, est très conservé de la levure à l'Homme. Il est constitué d'un assemblage en forme de tonneau de 28 sous-unités protéiques qui possède trois sites actifs protéolytiques distincts avec des spécificités différentes **(Figure 15)**. Ensemble, les trois sites actifs sont capables d'hydrolyser toutes les liaisons peptidiques, hormis les liaisons qui suivent la glycine et la proline [Ciechanover et al., 2000]. L'activité protéolytique du protéasome 20S est régulée par divers complexes protéiques, notamment par des activateurs (complexes PA700 (26S), complexes PA28 (11S)) ou par des inhibiteurs (HSP90, P131 et PR39) spécifiques [Dutaud et al., 2006]. Son activité est également diminuée à un pH acide. Bien que sa structure et que les propriétés biochimiques de ses régulateurs aient bien été caractérisées, leurs rôle et fonction physiologique demeurent encore controversés [Rechsteiner and Hill, 2005]. Toutefois, d'autres études ont permis de montrer que certaines molécules régulatrices de l'apoptose étaient également des substrats du protéasome, suggérant ainsi le rôle essentiel de cette voie protéolytique dans la régulation de l'apoptose [Jesenberger and Jentsch, 2002 ; Sun et al., 2004]. D'ailleurs,

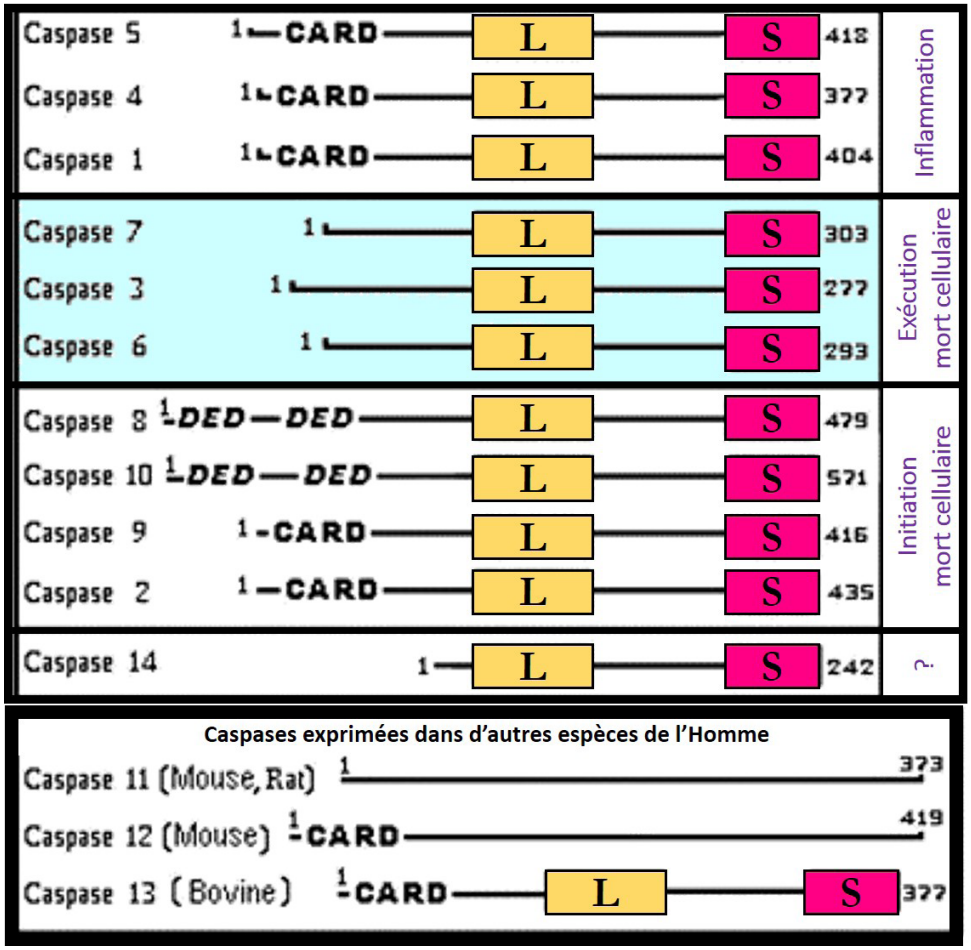


Figure 16. Représentation schématique des précurseurs de caspase identifiés chez l'homme ou exprimés uniquement chez certaines espèces animales

Les caspases humains sont regroupées sur la base de leur similarité de séquence. Les homologies de séquence divisent les caspases 1 à 10 en trois sous-familles, selon leur fonction physiologique et leur implication dans les processus inflammatoires, dans la phase d'initiation ou d'exécution de l'apoptose. La caspase 14 est séparée des autres parce qu'elle est exprimée seulement dans la peau et parce qu'elle est clivée au niveau de sites qui n'ont pas de résidu aspartate pour être activée. Les caspases actives sont constituées d'une grande sous-unité (L) et d'une petite sous-unité (S). L'activation des caspases nécessite des clivages (indiqués par des flèches). Ces derniers permettent d'éliminer les extrémités N-terminales et le fragment liant S et L, à l'exception des caspases 3, 10, 14 et 13. Les régions N-terminales de plusieurs caspases contiennent divers domaines essentiels aux interactions protéine-protéine au moment de l'activation (DED, Death Effector Domain et CARD, Caspase Recruitment Domain). Les nombres correspondent au nombre d'acides aminés des extrémités N- à C-terminales.

Adapté de *[Herrera-Mendez* et al.*, 2006]*

ce système protéolytique a été décrit comme un système endogène supplémentaire contribuant au processus d'attendrissage de la viande. Ce système dégraderait particulièrement la troponine C et les chaînes légères de myosine, et sa concentration dans les fibres oxydatives est plus importante que dans les fibres glycolytiques. Tout comme les calpaïnes, le protéasome 20S est associé à une dégradation des disques M et Z et serait un acteur important de la protéolyse des disques Z dans les fibres oxydatives [Sentandreu et al., 2002].

8. Les métalloprotéases

Les Métalloprotéases ou « métallo-endopeptidases de la matrice extracellulaire (MMPs) » forment une grande famille de peptidases Ca^{2+} dépendante. Elles possèdent dans leur site actif d'un atome métallique de Zinc qui participe à la catalyse de la coupure des liaisons peptidiques des protéines. Les MMPs sont impliquées dans le catabolisme du tissu conjonctif en ciblant notamment les substrats collagéniques, les glycoprotéines matricielles ou les protéoglycanes [Verma and Hansch, 2007]. L'activité des MMPs est contrôlée par l'activation de leurs précurseurs et par l'interaction avec leurs inhibiteurs. Chez le bovin, 18 isoformes de MMPs, dont le poids moléculaire est compris entre 25 et 75 kDa ont été identifiées ; leur expression et leurs inhibiteurs seraient dépendants du type de fibre musculaire [Sentandreu et al., 2002]. Les MMPs sont connues pour avoir un rôle dans l'embryogenèse et dans la formation des tissus. Elles auraient également, avec leurs inhibiteurs, un rôle dans l'apoptose.

9. Les peptidases apoptogènes : les caspases

Les Cysteinyl ASPartate-specific peptidASE (ou caspases) sont des peptidases à cystéine capables de cliver des protéines spécifiquement au niveau d'un résidu d'acide aspartique [Sentandreu et al., 2002]. Elles ont une structure très conservée, constituée de trois domaines: (i) le domaine N-terminal, structure très variable, dont le rôle principal est de favoriser les interactions protéine-protéine impliquées notamment dans la régulation de l'apoptose, puis un domaine catalytique subdivisé en deux sous-domaines, (ii) un grand domaine qui deviendra, après clivage, la grande sous-unité portant le site actif, et (iii) un petit domaine jouant un rôle dans la conformation de la protéine et qui deviendra, après clivage, la petite sous-unité. Inactive sous cette forme, une caspase doit subir divers clivages protéolytiques (clivage du domaine N-terminal, activation du site actif par interactions avec des complexes activateurs) pour être active **(Figure 16)**. Elles ont un rôle dans l'apoptose mais aussi dans d'autres mécanismes cellulaires tels que l'inflammation et l'immunité [Staal et al., 2011].

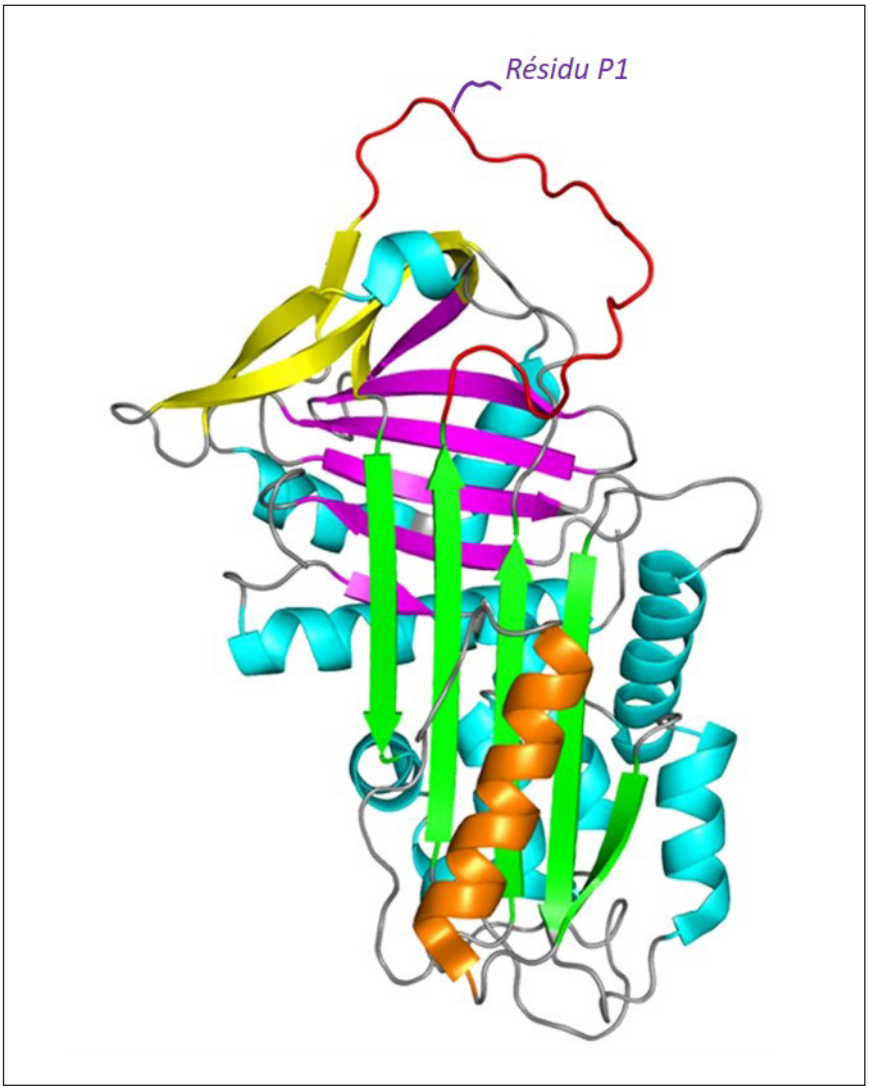


Figure 17. Structure cristallographique typique d'une SERPIN (SERPINA1 de *Bos taurus*)
La structure typique d'une SERPIN est constituée de trois feuillets β (vert, jaune et fushia), de neuf hélices α (bleu et orange) et d'une boucle d'inhibition ou RCL (pour l'anglais « *Reactive Center Loop* ») (rouge). Le résidu qui confère la spécificité de reconnaissance, nommé résidu P1, est aussi représenté au niveau de la boucle RCL (violet).

Dans le muscle, dès la mort de l'animal, l'apoptose se met en place afin de dégrader différents constituants du cytosquelette. Actives à des pH compris entre 5 et 6, les caspases interviennent durant les phases précoces de l'attendrissage, dès la mort de l'animal et notamment durant la phase de *rigor-mortis* [Ouali et al., 2006 ; Stennicke and Salvesen, 2000 ; Pulford et al., 2009]. Enfin, il a été montré que les caspases et les calpaïnes partagent des substrats communs suggérant qu'un mécanisme de communication (ou « cross-talk ») entre ces deux voies pourrait exister [Bizat et al., 2003]. Aussi, les calpaïnes contrôlent les caspases 3 et 9 en activant respectivement les pro-caspases 3 et 9, et sont capables de cliver des molécules du processus apoptotique BAX *(*facteur pro-apoptotique) [Wood et al., 1998]. Les caspases ont le pouvoir d'inactiver et de dégrader les calpastatines au cours de l'apoptose et ainsi dans le muscle *post-mortem* [Wang et al., 1998 ; Kemp and Wheeler, 2011 ; Wang, 2000]. L'ensemble de ces observations démontre une collaboration complexe entre ces différents acteurs et le processus d'apoptose.

10. Les protéases à serine et les SERPINs

Les protéases à sérine font référence à une grande famille d'enzymes très conservée au cours de l'évolution [Law et al., 2006]. Ces enzymes sont impliquées dans de nombreuses voies biologiques allant de la coagulation, à la fibrinolyse ou à l'inflammation. L'activité des sérines protéases est, entre autre, régulée par une classe spécifique de protéines inhibitrices appelée SERPINs pour « SERine Protease INhibitors ». Les SERPINs sont capables d'inhiber de multiples enzymes, mais elles restent assez sélectives des enzymes qui font partie de mécanismes biologiques conservés. C'est le cas par exemple de l'antithrombine (AT ou SERPINC1) qui inhibe de multiples enzymes impliquées dans la coagulation. La plupart des SERPINs contrôlent les cascades protéolytiques, alors que d'autres exécutent plutôt des fonctions diverses telles que le stockage (ovalbumine), le transport d'hormones (SERPINA7, ou thyroxine-binding globulin) ou agissent comme gènes suppresseurs de tumeur (SERPINB5, ou maspin) [Teoh et al., 2010 ; Gomes-Lima et al., 2018]

Les SERPINs (PM compris entre 40 et 60 kDa) sont des glycoprotéines globulaires présentant une structure particulière composées de chaînes de polypeptides et d'un nombre variable d'oligosaccharides [Gettins, 2002]. La structure des SERPINs est très conservée et se caractérise par la présence de 3 feuillets β, de 7 à 9 hélices α et d'une boucle réactive flexible, au sommet de la protéine, capable d'interagir avec les protéases **(Figure 17)**. Chez les eucaryotes, elles sont classées en 16 familles (A-P) et la protéine est désignée de la façon suivante : SERPINXy, « X » indiquant la famille d'appartenance et « y » le numéro de la SERPIN dans la famille).

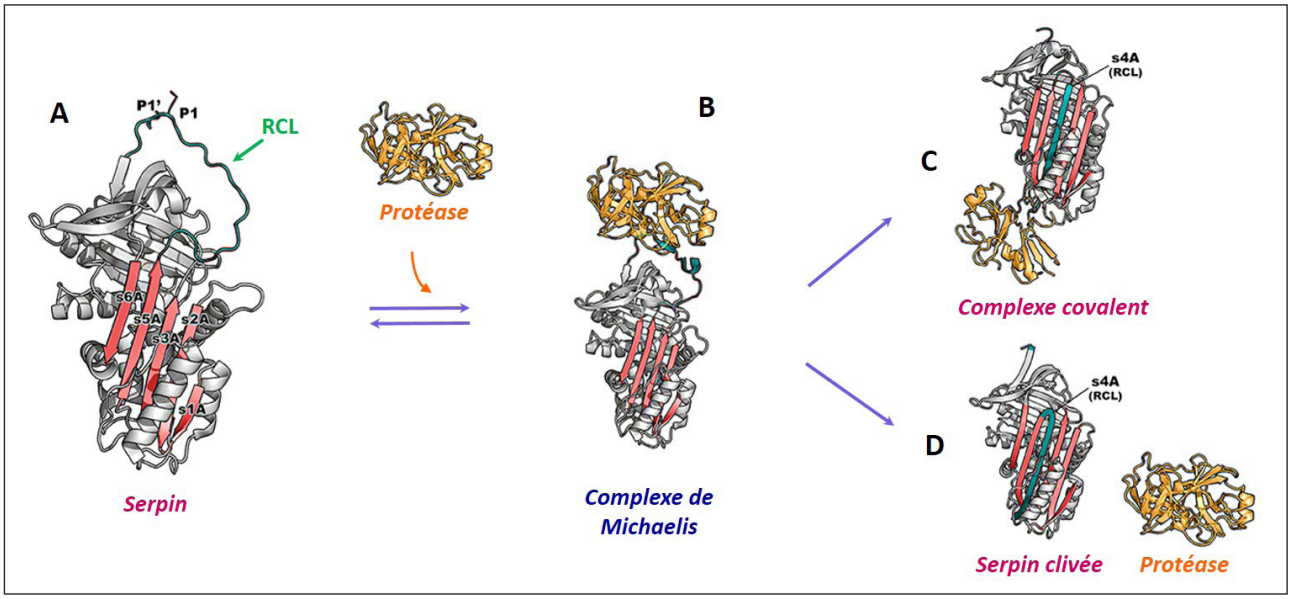


Figure 18. Représentation cristallographique du mode d'action des SERPINs

(A) Structure native d'une SERPIN. La boucle flexible réactive (RCL) identifiée avec la flèche verte contient le site de clivage pour la protéase (P1-P1'). Le feuillet β central composé de 5 brins est identifié en rouge. Ces deux régions jouent un rôle important dans le changement conformationnel des SERPINs. (B) La protéase cible reconnaît et lie au site de reconnaissance RCL de la SERPIN. Cette étape conduit à la formation du complexe réversible de Michaelis. (C) Au moment du clivage à P1-P1, la SERPIN se retrouve spontanément dans une conformation hyperstable, où la partie N-terminale du RCL clivé est insérée entre la feuille β-A centrale. Ce changement de conformation de la SERPIN entraîne un « piégeage » de la protéase qui devient liée de façon covalente à la SERPIN et par conséquent inactivée. Le complexe SERPIN -protéase sera ensuite éliminé de la circulation. (D) Dans certains cas (ex: SERPINs de transport), une SERPIN peut agir comme « substrat ». Dans ce cas, la protéase et la SERPIN ne restent pas liées par covalence libérant ainsi (i) une protéase active dissociée de la SERPIN d'une part et (ii) la SERPIN sous une forme clivée inactive d'autre part.

Les SERPINs inhibent leurs protéase cibles, en faisant disparaitre leur site actif, grâce à un mécanisme très conservé, qui implique un changement conformationnel spectaculaire et unique [Whisstock and Bottomley, 2006 ; Huntington, 2011]. Dans leur conformation native les SERPINs forment une boucle flexible (ou « reactive centre loop » (RCL) de 20-25 acides aminé) positionnée dans une conformation étendue au-dessus du corps de la molécule **(Figure 18A)**. À l'état natif, les SERPINs sont métastables, c'est-à-dire qu'elles ne sont pas sous leur forme la plus stable.

Par la suite, soit les SERPINs demeurent des complexes covalents stables avec l'enzyme, soit elles sont utilisées comme « substrat ». Dans ce dernier cas, l'enzyme active se dissocie. Ce n'est que depuis l'an 2000 que la première structure cristallographique du complexe SERPIN-protéase a été dévoilée [Huntington et al., 2000]. Lorsqu'elles deviennent fonctionnelles, les SERPINs agissent comme des « pièges moléculaires » : leur RCL fonctionnant comme un « appât » pour les protéases cibles car la séquence de cette région confère la spécificité inhibitrice aux SERPINs [Huntington and Carrell, 2001]. Le processus d'inhibition commence lorsqu'une protéase reconnaît « l'appât » et se lie à la SERPIN (liaison entre les résidus P1-protéase / P1'- RCL de la SERPIN) pour former un complexe réversible appelé « complexe de Michaelis » [Silverman et al., 2001] **(Figure 18B)**. La formation de ce complexe n'engendre pas de changement conformationnel majeur de la SERPIN. S'en suit le clivage de la liaison peptidique P1/P1' par une des sérines de la partie catalytique de la protéase (sérine n°195) conduisant une insertion de la boucle du RCL dans le corps de la SERPIN formant un intermédiaire acyle-enzyme (EI§) stable thermodynamiquement. Lorsque l'insertion de la boucle est assez rapide, le site actif de l'enzyme devient déformé et inactif, laissant le complexe protéase-SERPIN lié par covalence [Lawrence et al., 1995 ; Maddur et al., 2013] **(Figure 18C)**. Cette liaison étant irréversible, les SERPINs peuvent être considérées comme des « inhibiteurs du suicide ». Lorsque l'insertion de la boucle est trop lente, la liaison covalente est déstabilisée avant que le site actif de la protéase puisse être inactivé [Dementiev et al., 2003 ; Lawrence et al., 2000]. La SERPIN est alors digérée comme un substrat **(figure 18D)**.

V. Les qualités nutritionnelles de la viande bovine

La viande bovine est un aliment très riche sur le plan nutritionnel. Elle contribue significativement à nos besoins et apports alimentaires car c'est une source privilégiée de protéines (17 à 22% du tissu frais), bien équilibrée sur le plan des acides aminées indispensables et très digeste pour l'Homme [Rémond et al., 2010]. La viande rouge est également une source de fer qui, sous forme héminique, est très bien assimilé et 3 à 4 fois plus importante qu'une viande blanche de poulet ou de porc. Enfin elle est riche en

zinc, en vitamines (B3, B6 et B12), en sélénium et en oligo-éléments aux propriétés antioxydantes retrouvés essentiellement dans les produits d'origine animale [Tinggi, 2008 ; Volatier and Dufour, 2006 ; Salter, 2013]. Elle apporte aussi une quantité faible (ou modeste car variable) de lipides riches en acides gras saturés et mono-insaturés [Bauchart et Gandemer, 2010]. Même si la viande bovine reste une source importante d'acides gras poly-insaturés à longues chaînes, elle demeure bien équilibrée pour l'homme. De plus, en France, la teneur lipidique des morceaux nobles de viande bovine n'est que de l'ordre de 5% avant cuisson, alors qu'elle s'élève à près de 8 à 11% dans les pays anglo-saxons et encore plus dans les pays asiatiques, notamment pour le bœuf de Kobé au Japon [Bas et Sauvant, 2001]. La consommation journalière de 100 g de viande bovine couvre ainsi environ 40% des Apports Nutritionnels Conseillés (ANC) en protéines [Rémond et al., 2010], 20 à 30% des ANC en minéraux (fer, zinc et sélénium) et 20 à 40% des ANC en vitamines du groupe B. Elle couvre également 5% des ANC en acides gras poly-insaturés, 20% des ANC en acides gras mono-insaturés et 8% des ANC en acides gras saturés [Bourre, 2011; Bauchart et Gandemer, 2010]. Ainsi, la viande bovine contribuerait en moyenne à 5% des apports énergétiques quotidiens, avec respectivement 8% des apports en lipides, 16% des apports protéiques, et 11% des apports de fer [Hébel, 2012].

De nombreuses études ont attesté que la viande rouge et la charcuterie étaient dangereuses pour la santé car elles favoriseraient les maladies cardiovasculaires et le cancer du côlon [Corpet, 2011]. Cependant, une étude récente a remis en cause des dizaines d'études antérieures créant ainsi la controverse dans le monde scientifique [Johnston et al., 2019]. Ce réexamen par un collectif de chercheurs indépendants a montré que réduire la consommation de viande rouge abaisserait la mortalité par cancer de 7 morts pour 100 personnes, ce qui peut être considéré comme une baisse modérée [Johnston et al., 2019]. Ces résultats suggèrent ainsi des preuves incertaines sur la relation viande rouge/charcuterie avec les maladies cardiovasculaires, le diabète ou les risques de cancer.

Aujourd'hui, le Centre international de recherche sur le cancer associé à l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) classe la viande rouge comme « cancérogène probable » et la charcuterie comme « cancérogène ». Santé publique France recommande de limiter sa consommation de viandes rouges cuites à moins de 500 g/semaine, soit 70 g/jour (équivalent à 100 g de viande crue), et surtout de limiter la consommation de viandes transformées, notamment les charcuteries, à moins 150 g/semaine. Les enquêtes INCA (Etude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires réalisée tous les 7 ans) et Anses [Anses, 2007, 2017 ; Raude, 2008] ont montré que la grande majorité des consommateurs

français suivent ces recommandations, puisque seulement 20% des français sont de gros consommateurs (consommation de viandes rouges > 70 g/jour). Les problèmes de santé de ces gros consommateurs ne seraient pas essentiellement associés à leur consommation de viande rouge [Laporte et Mainsant, 2012 ; Salter, 2013].

Parce que pour la plupart des français les repas restent un moment important de la journée, un moment de partage et de plaisir, parce que notre gastronomie française ne serait rien sans notre bœuf bourguignon, notre blanquette de veau ou notre côte de bœuf, la consommation de viande rouge devrait rester « entre plaisir et équilibre ». Une alimentation équilibrée et variée, sans excès et « de qualité » serait donc l'alimentation à recommander.

VI. Les qualités sensorielles de la viande bovine

Les qualités sensorielles de la viande bovine, aussi appelées qualités organoleptiques, correspondent aux caractéristiques attendues et perçues par le consommateur grâce à ses sens. Elles sont au nombre de quatre : la couleur, la flaveur, la jutosité et la tendreté et sont étroitement dépendantes de la composition et des propriétés structurales du muscle, notamment de la trame conjonctive, des myofibrilles et des adipocytes [Listrat et al., 2015]. Comme nous allons le voir dans cette partie du manuscrit, elles sont aussi dépendantes des caractéristiques de l'animal et du muscle au moment de l'abattage [Hocquette et al., 2005] mais évoluent également au cours de la phase de maturation *post-mortem* [Maltin et al., 2003].

Les caractéristiques sensorielles sont appréciées par des jurys de dégustateurs entraînés qui évaluent, dans des conditions définies et normalisées, les différents critères descriptifs en lien avec différentes sens (aspect visuel, texture, odeur, goût) [Sensory analysis ISO 6658, 2017]. Cette évaluation peut également être réalisée par un jury de consommateurs « naïfs » ou par des mesures objectives instrumentales particulières.

1. La couleur

La couleur est une qualité visuelle importante car elle constitue la première caractéristique perçue par le consommateur. Avec l'appréciation du gras visible, de la forme et de la structure du morceau de viande, c'est souvent le critère de décision au moment de l'achat. La couleur dépend de la teneur et de l'état de la myoglobine du muscle [Monin, 1991], métalloprotéine pigmentaire contenant un atome de fer qui participe au stockage et au transport de l'oxygène dans le muscle [Renerre, 1990]. La teneur en myoglobine est variable selon la race, l'âge et l'alimentation mais aussi le type de muscle [Mancini and

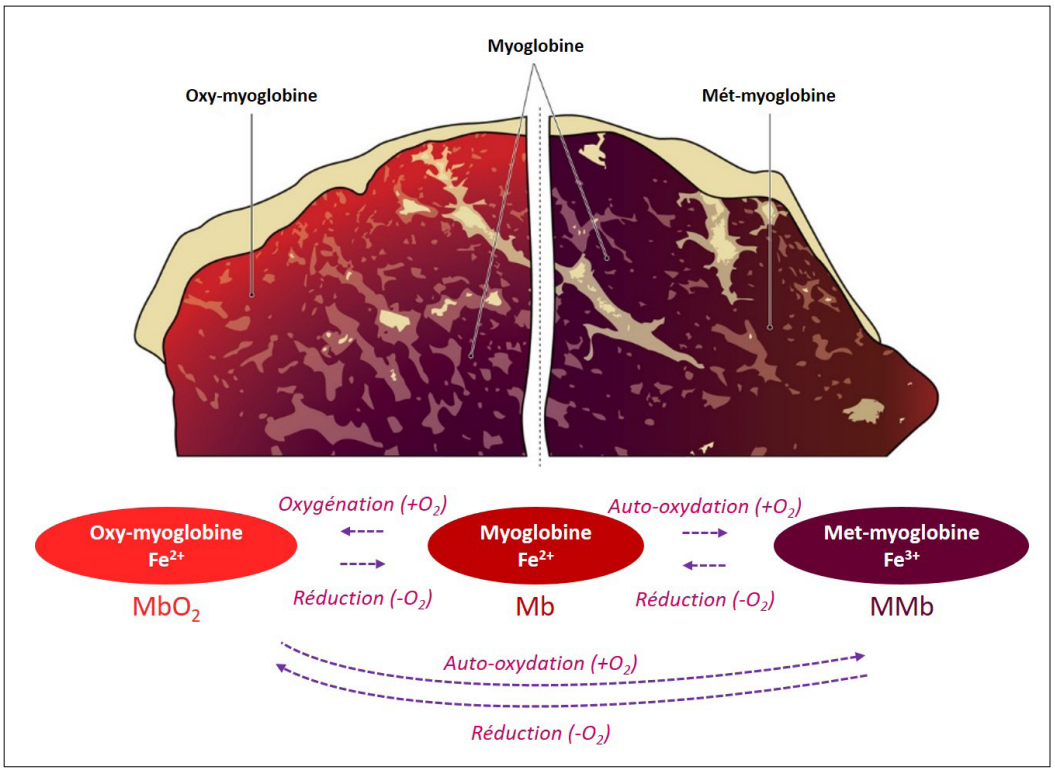


Figure 19. Modifications chimiques du pigment myoglobine liées à son oxygénation et au statut oxydatif du fer héminique

La myoglobine confère à la viande une couleur rouge pourpre en l'absence d'oxygène. Lorsque la myoglobine est sous forme oxygénée (ou « oxy-myoglobine »), la viande est plus lumineuse et apparaît rouge vif. L'oxydation du fer héminique renfermé dans la myoglobine (ou « Mét-myoglobine »), passant de l'état ferreux (Fe^{2+}) **à l›état ferrique (Fe**$^{3+}$), entraîne une coloration rouge-brune de la viande.

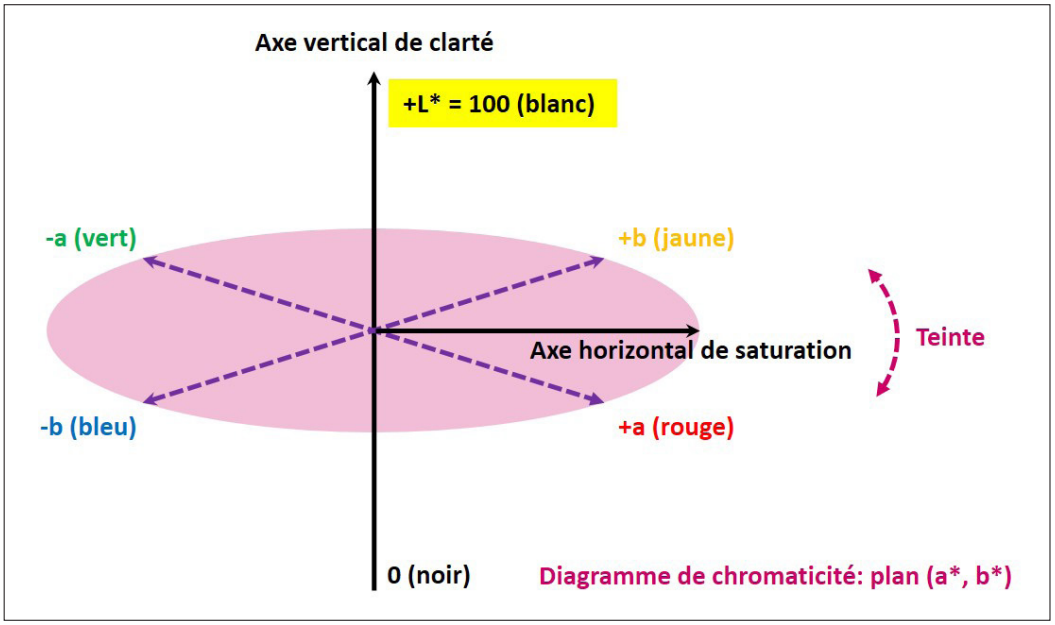


Figure 20. Le système CIELAB

Le système CIELAB est un modèle de représentation des couleurs développé par la Commission Internationale de l'Eclairage, en 1976. Différentes caractéristiques de couleur sont mesurées : luminosité (L*), indice de rouge (a*), indice de jaune (b*), teinte et saturation. Les mesures de couleur sont faites par spectro-colorimétrie dans le visible.

Hunt, 2005] : les fibres musculaires oxydatives à contraction lentes étant beaucoup plus riches en myoglobine que les fibres glycolytiques à contraction rapide [Renerre et al., 1992]. La couleur de la viande est aussi variable en fonction de l'état d'oxydation de la myoglobine **(Figure 19)** : (i) une myoglobine réduite non oxygénée est de couleur rouge pourpre, (ii) une myoglobine réduite oxygénée est rouge-vif, (iii) une myoglobine oxydée est rouge-brun. La couleur de la viande, généralement associée par le consommateur à son état de fraîcheur, s'altère rapidement au cours de la conservation induisant des réactions de rejet face à des viandes de couleur rouge-brun. La couleur de la viande est aussi influencée par l'évolution du pH *post-mortem* qui peut modifier la structure musculaire. Cette évolution du pH est dépendante de la consommation en oxygène par les mitochondries après abattage [Monin, 1991]. A pH élevé (pH>6), l'activité mitochondriale est plus facilement maintenue et la capacité de rétention d'eau est forte. Ceci favorise respectivement la réduction de la myoglobine et la diminution de l'absorption de la lumière donnant à la viande une couleur très sombre [Abril et al., 2001 ; Offer et al., 1989]. La teneur et la répartition du gras intermusculaire (marbré) et intramusculaire (persillé, LIM) influencent également le choix du consommateur : le gras visible étant souvent défavorable au choix des français.

Le couleur de la viande peut être estimée visuellement par un jury de dégustation, mais peut également être évaluée par une mesure physique colorimétrique avec un spectrophotomètre de type Minolta [Kerry and Ledward, 2009]. Cet appareil décompose la couleur de la viande au travers de trois indicateurs CIE L*a*b* (système CIELAB) **(Figure 20)** : la valeur de luminance (L*), la nuance bleu-rouge avec l'indice de rouge (a*) et la nuance vert-jaune avec l'indice jaune (b*). L'ensemble permet de calculer un indice de saturation (C*= (a*2 + b* 2)0,5) et l'angle de teinte (h) (arctan=b*/a*), cette dernière étant le paramètre colorimétrique le mieux corrélé à l'intensité de couleur rouge estimée par un jury.

2. La tendreté

La tendreté correspond à la facilité avec laquelle la viande peut être cisaillée et broyée lors de la mastication [Ouali et al., 2006]. Il s'agit de la caractéristique organoleptique la plus recherchée par les consommateurs [Touraille, 1994 ; Grunert et al., 2004]. C'est aussi la qualité sensorielle qui présente la variabilité la plus importante ; elle est très difficile à maîtriser et souvent source d'insatisfaction pour les consommateurs. Chez le bovin, la tendreté est principalement dépendante de deux facteurs structuraux : (i) l'abondance et la nature du tissu conjonctif, notamment sa composante collagénique, ainsi que (ii) la structure myofibrillaire en lien avec les protéines myofibrillaires et autres protéines associées qui la constituent et qui assurent son intégrité structurale [Lebret and Picard, 2015 ; Guillemin et al., 2009a].

Présent notamment dans le *périmysium* et l'*endomysium*, le collagène peut représenter jusqu'à 15% de la matière sèche du muscle [Purslow, 2005]. C'est une protéine fibreuse très résistante au vu de sa structure en triple hélice qui permet l'établissement de liaisons inter- et intra- moléculaires. Ces liaisons (ou cross-links) sont relativement stables durant la phase *post-mortem* et sont peu sensibles aux traitements technologiques. La teneur et la solubilité du collagène ont une influence sur la dureté de base de la viande. Une viande sera donc d'autant plus dure que sa teneur en collagène sera élevée et que sa solubilité sera faible [Lepetit, 2004]. Ces propriétés collagéniques influencent notamment le mode de cuisson des viandes : les muscles riches en collagène auront tendance à fournir une viande plus dure nécessitant un temps et une température de cuisson plus importante (viande à bouillir), alors que des viandes issues de muscles pauvres en collagène seront plutôt à griller. Les types musculaires associés aux cross-links et à la quantité de collagène sont également déterminants pour la qualité de la viande, en particulier pour la tendreté. En effet, les muscles les moins tendres (ex : le muscle *Semimembranosus*) ont tendance à être plus riches en en collagène (3%) et en cross-links, alors que les muscles les plus tendres (ex : le muscle *Longissimus*) ont tendance à être plutôt pauvres en collagène (1,86%) et en liaisons moléculaires. Cependant certains muscles présentent une bonne tendreté alors qu'ils ont beaucoup de collagène (2,77%) et peu de cross-links (ex : le muscle *Gluteus medius*) ou peu de collagène (1,41%) et beaucoup de cross-links ; ce qui suggère que le collagène et les cross-links ont un effet additif en diminuant la tendreté [McCormick, 1999]. Peu sensible aux protéases, le type de collagène, de par la sensibilité spécifique de certaines isoformes, a une influence sur la solubilité du collagène. Ainsi le collagène de type III, plus sensible aux protéases favoriserait la tendreté [Monin, 1991], les collagènes de type XII et XIV (présents dans le *périmysium)* diminueraient la solubilité du collagène total et ainsi la tendreté [Listrat et al., 2000]. Cependant, il reste difficile de relier avec certitude le type de collagène et sa teneur avec la tendreté, car deux muscles présentant une teneur, une composition et une solubilité identiques en collagène peuvent avoir une tendreté différente, ceci en raison des caractéristiques des myofibrilles qui s'opposent à la contraction du collagène [Lepetit, 2004].

La composante myofibrillaire joue également un rôle important au cours de la maturation de la viande car son évolution *post-mortem* est à l'origine de l'attendrissage de la viande. La protéolyse *post-mortem* favorise en effet la désorganisation de la structure myofibrillaire sous l'action de différents systèmes protéolytiques [Koohmaraie et al., 2002]. C'est ce que nous verrons dans la suite de ce manuscrit.

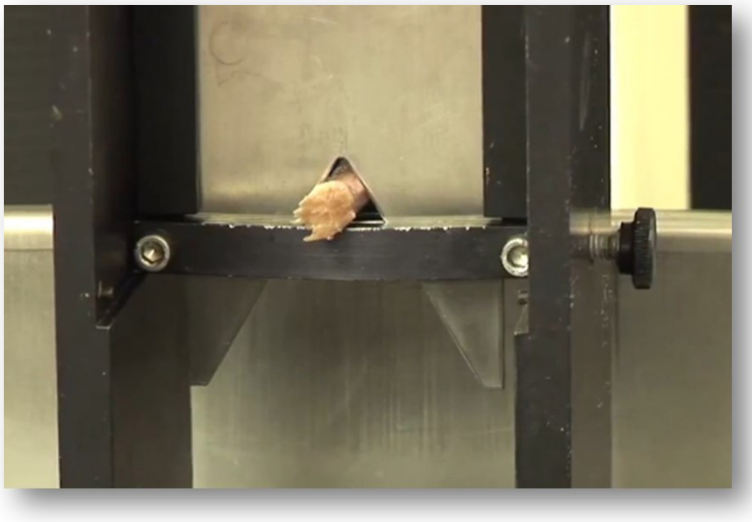


Figure 21. Appareil de mesure de la force de cisaillement de Warner Bratzler
Source image: https://meatscience.org/

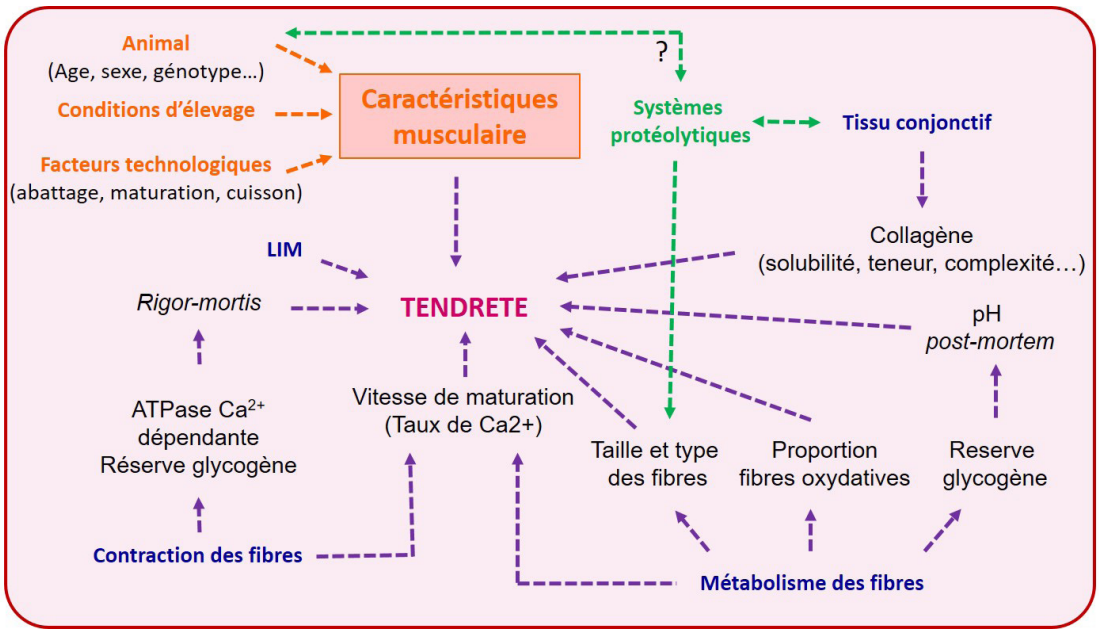


Figure 22. Représentation schématique des principaux facteurs influençant la tendreté
La tendreté de la viande dépend de nombreux facteurs. L'animal lui-même (âge, race, sexe, génotype), ses conditions d'élevage (vitesse de croissance, alimentation) ou les facteurs technologiques *post-mortem*, induisent des modifications des caractéristiques biologiques du muscle et par conséquent des variations de tendreté. Toutefois, moins d'un tiers à un quart de la variabilité des qualités sensorielles et notamment de la tendreté et de la flaveur ont pu être expliquées par la variabilité des caractéristiques musculaires de l'animal vivant [Renand et al., 2001]. Parmi les principaux facteurs influençant la tendreté, on trouve les systèmes protéolytiques, les caractéristiques du tissu conjonctif, les caractéristiques contractiles et métaboliques des fibres musculaires, la quantité de lipides intramusculaires (LIM). Cette liste est non-exhaustive.

$$\text{Index (Idx)} = \frac{Tg - m(Tg)}{\sigma(Tg)} - \frac{WB - m(WB)}{\sigma(WB)}$$

Figure 23. Formule mathématique pour déterminer l'indice synthétique de la tendreté Idx
m : moyenne, Tg: note de tendreté sensorielle, WB: note de tendreté mécanique évaluée par la Warner Bratzler shear force, **σ**: écart-type

La tendreté de la viande peut être évaluée par un jury de dégustation, mais aussi de façon objective par une mesure mécanique. De nombreux tests mécaniques (ou rhéologiques) sont disponibles pour mesurer la dureté de la viande, comme par exemple le test de cisaillement, le test de compression, le test de tension, le test de morsure ou le découpage par lames multiples [Lepetit and Culioli, 1994 ; Evrat-Georgel C., 2008]. La mesure de la force de cisaillement, ou test de Warner-Bratzler Shear Force (WB), est la méthode physique la plus utilisée pour mesurer la tendreté de la viande **(Figure 21)**. Elle consiste à mesurer la contrainte mécanique nécessaire pour faire passer une arête tranchante à travers un morceau de viande perpendiculairement aux fibres musculaires [Evrat-Georgel C., 2008]. Les mesures peuvent être réalisées sur des échantillons de viande crue ou cuite.

Ainsi, comme nous avons pu le voir de façon non-exhaustive au travers de ce paragraphe, la variabilité de la tendreté est la résultante de nombreux facteurs **(Figure 22)** ; c'est la raison pour laquelle les études traitant de cette caractéristique organoleptique utilisent souvent conjointement les deux méthodes d'évaluation sensorielle et mécanique. Certaines études calculent également un « index de tendreté » en combinant à la fois la note de tendreté estimée par analyse sensorielle et la valeur de la force de cisaillement **(Figure 23)** [Picard et al., 2014].

3. La flaveur

La flaveur est une qualité organoleptique complexe qui fait appel aux perceptions gustatives et olfactives. Etroitement associée aux lipides intramusculaires et aux substances liposolubles (substances aromatiques…), la flaveur est variable en fonction l'âge et du type musculaire : les fibres rouges lentes qui présentent un métabolisme oxydatif augmentent avec l'âge et favorisent 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 se développe également au cours de la cuisson qui va induire la production de composés aromatiques volatiles par le biais de modifications biochimiques complexes. Deux types de réactions se produisent au cours de la cuisson : (i) la réaction de Maillard (entre les acides aminés et les sucres réducteurs) et (ii) la dégradation des lipides, triglycérides et phospholipides [Mottram, 1998]. Toutefois, l'oxydation des lipides, mécanisme favorisé par la présence d'acides gras insaturés, peut conduire au développement d'une flaveur désagréable (rance), notamment lors d'une cuisson lente à basse température ou lors d'une conservation prolongée de la viande [Campo et al., 2006].

4. La jutosité

La jutosité de la viande est une caractéristique organoleptique qui s'exprime lors de la mastication. Le facteur essentiel influençant la jutosité est le pouvoir de rétention d'eau du muscle (PRE). Ce dernier dépend de l'eau retenue au niveau des myofibrilles et donc de la structure spatiale des protéines des fibres musculaires [Ertbjerg and Puolanne, 2017]. La mastication induit une libération d'eau ainsi qu'une stimulation salivaire favorisée par la présence de lipides [Monin, 1991]. La teneur en eau est variable en fonction du type musculaire et est inversement reliée à la teneur en lipides intramusculaires. Il a été clairement montré que les évènements *post-mortem*, à savoir l'amplitude et la vitesse du chute du pH, la protéolyse et l'oxydation des protéines sont des facteurs clés qui influencent la capacité des viandes à retenir l'eau [Rowe et al., 2004 ; Huff-Lonergan and Lonergan, 2005]. Une viande à pH très faible aura tendance à perdre son eau et devenir sèche alors qu'une viande à pH élevé aura tendance à avoir une bonne rétention d'eau favorable à une jutosité supérieure [Touraille, 1994]. Il a également été rapporté que la capacité de rétention d'eau était plus importante dans les muscles à fibres rouges oxydatives que dans les muscles à fibres blanches glycolytiques [Maltin et al., 1997 ; Hocquette et al., 1998]. Très complexe et subjective, la jutosité peut être évaluée par un jury de dégustation ou par des mesures de capacité de rétention d'eau. Toutefois, la jutosité reste la qualité organoleptique la moins étudiée.

VII. Les facteurs de variations des qualités sensorielles

Les qualités sensorielles sont dépendantes d'un grand nombre de facteurs intervenant tout au long de la vie de l'animal : son déterminisme génétique (âge, sexe, race), sa conduite d'élevage, ses conditions d'abattage ainsi que les facteurs technologiques lors de la maturation et la cuisson [Picard and Kondjoyan, 2019] .

1. L'âge

Même si cette influence est moindre durant les phases précoces de développement [Oury et al., 2007 ; Micol et al., 2010], la croissance et le vieillissement des animaux modifient la structure et la composition de leurs muscles. Il en résultera des modifications des qualités sensorielles, notamment de la tendreté, de la flaveur et de la couleur des viandes. Il a en particulier été observé qu'une augmentation de la dureté des viandes, principalement en raison d'une diminution de la solubilité du collagène et une augmentation du nombre de liaisons moléculaires, conduisait à une augmentation de la rigidité du réseau de collagène chez des animaux âgés [Gerrard et al., 1987 ; McCormick, 2009]. Au cours du vieillissement,

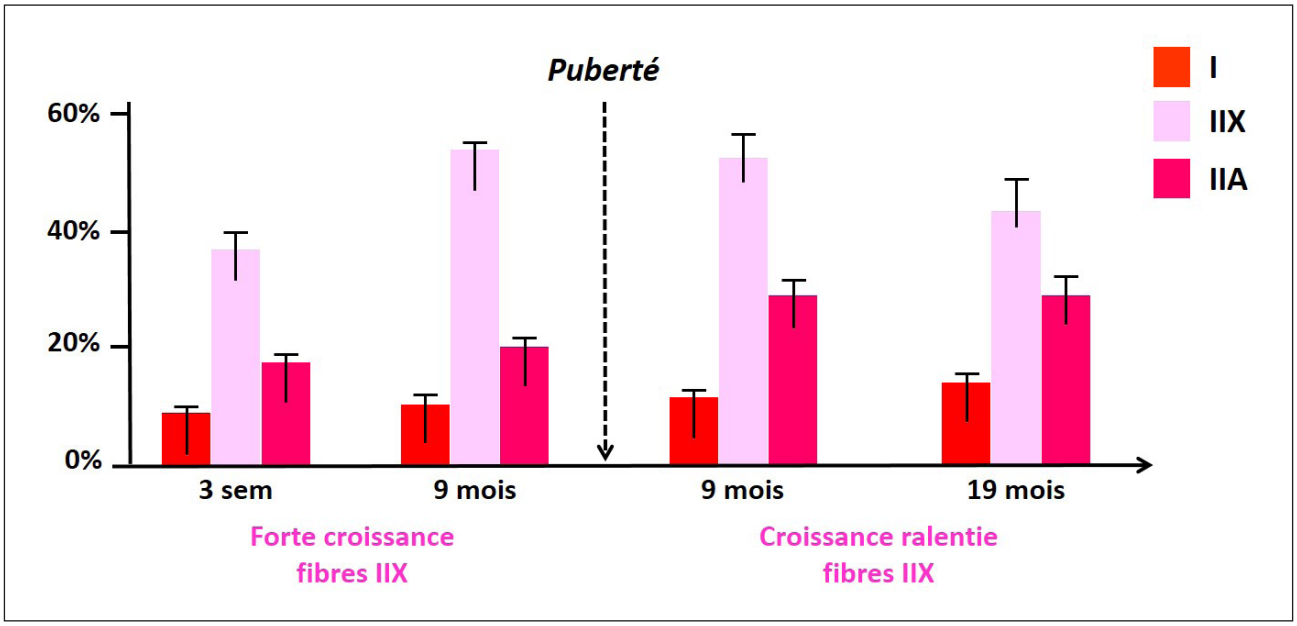


Figure 24. Evolution avec l'âge de la proportion des différents types de fibres musculaires dans le muscle *Semitendinosus* de bovins

D'après [Duris, 1999]

la structure contractile du muscle devient moins sensible à l'action des protéases endogènes ce qui influence également la variabilité de la tendreté [Ouali, 1990]. L'augmentation de l'activité oxydative des fibres musculaires et de la teneur en lipides intramusculaires au cours du vieillissement contribuent au développement de la flaveur de la viande [Jurie et al., 1995]. La proportion des types de fibres évolue également durant la vie de l'animal **(Figure 24)**. De la naissance à l'âge de 12 mois, le bovin mâle présente une diminution de la proportion de fibres IIA de type rapide oxydo-glycolytique, au bénéfice des fibres IIX de type rapide glycolytique, favorisant ainsi l'accroissement de l'activité glycolytique du muscle [Jurie et al., 1995]. Après 12 mois, cette évolution se ralentit jusqu'à s'inverser 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 musculaires [Geay et Renand, 1994] favorable au développement d'une meilleure flaveur et jutosité. La couleur de la viande est également modifiée au cours du vieillissement. Ceci peut s'expliquer par une augmentation de la teneur en myoglobine dans le muscle, elle-même associée aux modifications des propriétés contractiles et métaboliques. La couleur est ainsi d'autant plus claire que les animaux sont abattus jeunes [Renerre, 1982].

2. Le sexe

Le facteur sexe influence particulièrement la couleur et la tendreté, notamment car les caractéristiques musculaires évoluent différemment chez les mâles et les femelles [Micol et al., 2010]. À âge égal, en lien avec les effets des hormones sexuelles, les génisses donnent généralement des viandes plus rouges que les taurillons en raison d'une augmentation de la teneur en myoglobine plus rapide au cours de leur croissance [Monin, 1991]. La viande de génisse est également plus tendre, la teneur en collagène et son insolubilité étant plus élevées chez le taurillon [Hanzelková et al., 2011]. En lien avec l'effet des androgènes, la taille des fibres musculaires semble également jouer un rôle important car les taurillons présentent des fibres plus grosses que celles des génisses. La flaveur de la viande est également influencée par le sexe des animaux. L'engraissement des génisses étant plus rapide que celui des taurillons, leur viande présente un degré de persillé plus important, elles sont donc plus goûteuses. Chez les bœufs (mâles castrés), la proportion de masse grasse est intermédiaire entre celle des génisses et celle des taurillons, ainsi la flaveur de leur viande apparaît supérieure à celle des taurillons mais inférieure à celle des génisses au même âge [Geay et Renand, 1994]. Les taurillons sont connus pour être plus efficients dans la conversion des aliments en muscles que les génisses [Crouse et al., 1987]. Cela tend à expliquer l'utilisation privilégiée des taurillons dans l'industrie de la viande en Europe. En effet, les génisses sont

vendues à un prix plus élevé, ainsi elles restent privilégiées dans les secteurs d'excellence car la tendreté des femelles, particulièrement des génisses, est toujours supérieure à celle des mâles, au même âge et pour différents types musculaires [Hanzelková et al., 2011]. Aussi, la solubilité du collagène diminue avec l'âge de l'animal en raison de l'augmentation du nombre de liaisons moléculaires, avec pour conséquence une viande moins tendre. De plus, les femelles présentent une teneur en collagène plus faible que les mâles castrés et ces derniers en possèdent moins que les mâles entiers. Sur ce critère, au même âge, la viande des femelles a tendance à être plus tendre que celle des bœufs, elle-même plus tendre que celle des mâles entiers [Hocquette et al., 2005].

3. La race et le génotype

Les génotypes, le potentiel de développement musculaire et de la maturité physiologique étant très variables entre les races laitières, mixtes et à viande, la comparaison entre races des qualités sensorielles est très difficile à interpréter [Micol et al., 2010]. Des études ont montré des différences significatives de la tendreté de viandes maturées entre 1 et 7 jours provenant de 4 races : une race laitière (Holstein), une race mixte (Brown Swiss) et deux races à viande (Limousine, Blonde d'Aquitaine). En début de la maturation, les viandes issues des races à viande sont en effet plus tendres que les autres viandes, mais ces différences tendent à s'estomper au cours de la maturation [Monsón et al., 2005]. C'est également ce qu'une autre équipe a montré en comparant des viandes de bœufs Holstein, moins tendres que des viandes de bœufs Charolais ou Aberdeen Angus [Sinclair et al., 2001].

Les qualités sensorielles de la viande sont dépendantes de la race de l'animal dont elles sont issues, mais également de la variabilité individuelle au sein de chaque race [Renand et al., 2001 ; Gagaoua et al., 2019]. Une étude comparant deux races rustiques (Aubrac et Salers) et deux races à viandes (Charolaise et Limousine) n'a cependant pas montré de différence significative entre les qualités sensorielles, bien que les qualités soient légèrement supérieures pour les races Limousine et Aubrac pour des animaux conduits dans des conditions strictement identiques [Dransfield et al., 2003]. En revanche, ces animaux diffèrent par leurs caractéristiques musculaires [Jurie et al., 2005] : les animaux de race Limousine présentent un métabolisme plus glycolytique avec une proportion plus élevée de fibres rapides glycolytiques que les animaux de race Salers. Ils sont également caractérisés par une teneur réduite en collagène insoluble favorisant la tendreté. Des études menées sur des effectifs plus importants de 11 races européennes ont mis en évidence des différences significatives de tendreté, jutosité et flaveur [Olleta and al., 2006]. Enfin, la couleur est également variable en fonction des races car elles présentent des

Figure 25. Bovins de type « culard »
Bovins de race Charolaise (A) et Blanc bleu belge (B) présentant une hypertrophie musculaire liée à des mutations dans le gène de la myostatine.
Sources: https://twitter.com/Aubracs

différences de précocité [Micol et al., 2010]. Ces différences sont particulièrement marquées durant la phase de croissance des animaux, avant que ces derniers aient atteint leur maturité physiologique.

Depuis les années 50, afin d'accroître la production de viande, la sélection des bovins s'est orientée vers la production de bovins à fort potentiel de développement musculaire. De nombreuses études ont été menées pour comprendre les effets du patrimoine génétique sur la variabilité des caractéristiques musculaires, ainsi que sur les qualités sensorielles des viandes. Le génotype « culard » est un des plus étudiés **(Figure 25)**. Il fait référence à des mutations mono-géniques du gène de la myostatine, un membre de la superfamille des facteurs de croissance TGF-β [McPherron et al., 1997 ; Grobet et al., 1997], qui joue un rôle majeur dans la croissance et le développement musculaire. Les animaux qui présentent une mutation de ce gène affichent une augmentation marquée de la masse musculaire qui se traduit par une augmentation du nombre de fibres rapides glycolytiques IIX, tout comme les bovins sélectionnés pour leur forte croissance [Picard et al., 2006]. Chez ces animaux, les teneurs en lipides intramusculaires et en collagène sont diminuées. Le collagène est également plus soluble. Par conséquent, la sélection n'est pas toujours sans conséquences car les animaux culards génèrent une viande plus tendre, mais avec des défauts de couleur (pâle) et peu de flaveur.

4. Le niveau et la nature de l'alimentation

L'alimentation des bovins permet de moduler la vitesse de croissance, le développement musculaire ainsi que ses caractéristiques. En modulant le niveau d'alimentation et la nature des apports énergétiques et azotés, une variabilité des caractéristiques musculaires des animaux peut être induite et modifier ainsi de façon plus ou moins importante les qualités sensorielles de la viande [Geay et al., 2002].

• **La 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 également 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]. L'ensemble de ces caractéristiques sont défavorables à la tendreté de la viande. La flaveur est également altérée en raison d'une diminution des dépôts adipeux et des lipides intramusculaires. Inversement, lorsque le niveau alimentaire s'accroît, notamment durant la phase de finition, les qualités sensorielles des viandes sont alors améliorées. La couleur de la viande semble être moins affectée par le niveau de l'alimentation.

• **La croissance compensatrice**, qui correspond à une alternance (volontaire ou non) de périodes d'apports alimentaires réduits ou élevés, permet une reprise de la croissance [Hoch et al., 2003]. Ce type de pratique est utilisée par les éleveurs qui souhaitent rationner les animaux l'hiver pour des raisons économiques (diminution des apports de fourrages et de concentrés), afin optimiser la croissance des animaux lorsqu'ils retrouveront les pâturages au printemps. Les conséquences de la croissance compensatrices sont variables selon les expérimentations. Certains auteurs ont rapporté une amélioration de la tendreté du muscle *Semitendinosus* possiblement liée à une néo-synthèse de collagène très soluble [Allingham et al., 1998 ; Listrat et al., 1999]. Cette amélioration de la tendreté peut également être expliquée par une augmentation de la proportion de fibres rapides glycolytiques [Picard et al., 1995]. Un effet positif de cette croissance compensatrice sur les caractéristiques musculaires améliorant ainsi la texture et l'apparence de la viande (couleur et gras visible) de jeunes taurillons Holstein Friesian a également été rapportée [Hansen et al., 2006]. Cependant, cet effet n'a été observé que sur le muscle *Semimembranosus*. Les muscles *Longissimus thoracis* et *Supraspinatus* de ces mêmes animaux avaient tendance à développer des odeurs de ranci, bien que négligeables selon le mode de préparation des viandes. [Cassar-Malek et al., 2004] ont montré des effets modérés de la croissance compensatrice sur les caractéristiques musculaires en faveur d'une amélioration de la tendreté de la viande de taurillons Montbéliards du fait d'une augmentation de la solubilité du collagène des muscles *Semitendinosus* et *Triceps brachii*. D'autres études ne rapportent aucune modification des qualités sensorielles suite à une croissance compensatrice [Sinclair et al., 2001]. L'ensemble de ces résultats suggère, comme décrit dans plusieurs études, que les effets de la croissance compensatrice dépendent de la sévérité et de la durée de la période de restriction, mais aussi de la durée de la période de réalimentation, de l'âge, du génotype de l'animal et du type de muscle [Andersen et al., 2005 ; Hansen et al., 2006].

• **La nature de la ration** a également une influence sur les caractéristiques musculaires et sur les propriétés sensorielles des viandes. Cependant, ces effets sont généralement confondus avec des modifications quantitatives du niveau d'alimentation ou du système de production associé (activité physique, âge). Une étude réalisée chez des bœufs Charolais de 20 mois a 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, la solubilité du collagène était également plus élevée chez ces animaux [Jurie et al., 1999]. Toutefois, il est difficile d'associer ces effets, pourtant favorables à une meilleure tendreté, à la nature de l'alimentation plutôt qu'à son niveau, ou à l'exercice physique qui reste difficilement quantifiable lorsque les animaux sont au pâturage. 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]. Cependant, il a été montré qu'une finition au pâturage présente certains avantages par rapport à un régime mixte (foin, ensilage de maïs) car il diminue l'oxydation des lipides et, dans une moindre mesure, celle de la myoglobine [Gatellier et al., 2005].

• **L'utilisation de supplémentations alimentaires** peut également améliorer les qualités sensorielles de la viande bovine. Certains auteurs ont montré que l'administration de vitamine D3 était capable d'induire une augmentation des concentrations plasmatiques de calcium. Ce dernier à la capacité d'activer les systèmes protéolytiques *post-mortem* et par conséquent de favoriser la tendreté [Swanek et al., 1999 ; Montgomery et al., 2000]. La vitamine E, par ses propriétés antioxydantes, a des effets bénéfiques sur la couleur et la flaveur de la viande. Elle permet d'augmenter la concentration en α-tocophérol dans le muscle, et ainsi de réduire l'oxydation des lipides membranaires qui sont à l'origine du rancissement de la viande et de l'oxydation de la myoglobine, responsable du brunissement de la viande [Liu et al., 1995 ; Gobert et al., 2010].

5. Les facteurs liés aux conditions d'abattage et au transport

Les conditions de transport des animaux de la zone d'élevage à l'abattoir, ainsi que les méthodes d'abattage des animaux sont associées à une multitude de facteurs (changement de milieu, activités non habituelles, perte de ses congénères, mise à jeun…) pouvant induire un stress important de l'animal [Terlouw, 2015 ; Terlouw et al., 2009]. Ces conditions stressantes entraînent des modifications du métabolisme musculaire durant les périodes *anté-* et *post-mortem*, et par conséquent ont une influence sur les qualités sensorielles de la viande. L'ensemble de ces conditions stressantes contribue à l'épuisement précoce des réserves énergétiques (glycogène) du muscle. Ainsi, après abattage, la production d'acide lactique sera diminuée. En condition de stress, le pH de la viande musculaire restera élevé (pH>6) et la viande issue de ces animaux sera de couleur sombre et présentera une mauvaise aptitude à la conservation, ce pH étant favorable au développement des flores microbiennes et des pathogènes. Toutefois, à pH élevé (pH>6,2), les viandes possèdent un très bon pouvoir de rétention en eau et une tendreté supérieure comparativement à la tendreté des viandes qui ont pH ultime normal (pH 5,5 – 5,7). Cette amélioration de la tendreté est également liée à une activité protéolytique plus intense [Culioli, 1999]. Ainsi, ces viandes

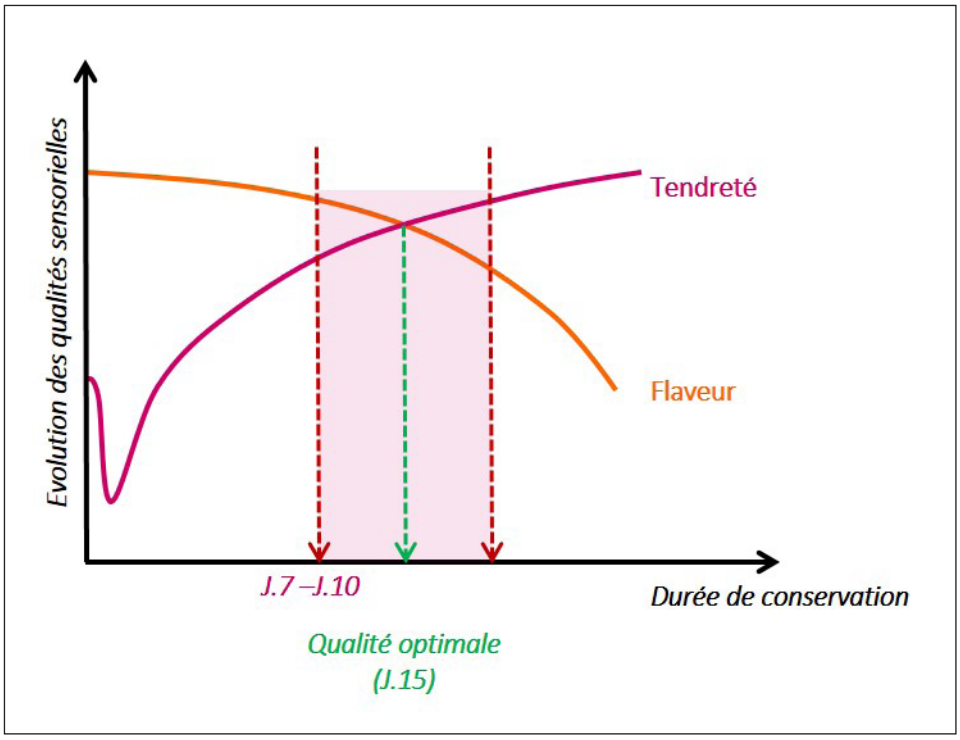


Figure 26. Maturation et conservation de la viande bovine
Une conservation de 7-10 jours assure une tendreté et une saveur suffisante (température de conservation entre 0°C et + 4°C). Au bout de 15 jours, les qualités organoleptiques (tendreté et flaveur) sont optimales. La tendreté et la flaveur évoluent en sens inverse.
Adapté de [Bidault, 1927]

sont tout à fait propres à la consommation, mais dans un délai plus court que la normale [Gagaoua et al., 2019].

6. La conservation et la maturation de la viande

Les conditions de conservation sont des facteurs importants pouvant influencer les qualités sensorielles [Ouali, 1991; Culioli, 1999]. 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. D'ailleurs, [Ouali, 1991] a montré l'importance de la vitesse de réfrigération des carcasses sur la tendreté de la viande. Une réfrigération trop rapide peut conduire à une dureté excessive de la viande, et ceci de manière irréversible. Cette altération de la tendreté est liée au phénomène de la contracture au froid (cold-shortening) qui touche principalement les muscles à contraction rapide. Cette contracture est irréversible car les fibres musculaires sont entrées en rigidité cadavérique alors qu'elles étaient contractées. Le Ca^{2+} peut induire une très forte contraction des muscles, mais il est également capable d'activer très fortement les calpaïnes endogènes impliquées dans la dégradation des structures myofibrillaires et la maturation de la viande. Ainsi, une réfrigération ultra-rapide impliquant un relargage massif de Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique peut conduire à des viandes relativement tendres [Culioli, 1999]. Les conditions de réfrigération de la viande doivent donc être maîtrisées afin de limiter au mieux la variabilité de la tendreté.

La maturation de la viande est une étape primordiale pour l'obtention de la qualité finale de la viande. Différentes études ont montré une association entre durée de maturation longue et tendreté de la viande [Morgan et al., 1991]. Cependant, l'évolution de la tendreté au cours de la maturation varie fortement entre les animaux et entre les muscles, notamment en fonction de leur composante collagénique et de leur type métabolique : la durée de maturation peut ainsi varier de quelques jours à plusieurs semaines. On sait dorénavant qu'il faut un minimum de 7 à 10 jours de maturation pour que la viande soit « consommable » [Bidault, 1927] **(Figure 26)**. Néanmoins, il sera préférable d'aller jusqu'à 14 jours pour obtenir une maturation acceptable associée à une tendreté élevée [Monsón et al., 2005]. Cependant, pour des raisons économiques, la durée de maturation des viandes est souvent raccourcie à 8 jours en moyenne, ce qui donne lieu à des viandes plus ou moins tendres. À l'instar de l'affinage du fromage ou du vieillissement du vin, le bœuf demande du temps pour obtenir une viande goûteuse et tendre. Depuis quelques années, on assiste au développement de caves de maturation qui permettent de conserver la viande au-delà de 14 à 21 jours. Ce processus est favorable au développement de la tendreté

et de la flaveur, notamment au travers de la protéolyse et de la diffusion du gras. Au sein de ces caves de maturation, la température (1-4°C) et l'hygrométrie (basse) sont rigoureusement contrôlées afin de permettre une maturation optimale pouvant aller jusqu'à 30, 60, 90 jours, voire même plus… Cependant, plus la viande va mâturer, plus elle va perdre du poids (1% par jour en moyenne), augmentant ainsi le prix de de vente pour le consommateur, mais les qualités gustatives de la viande sont reconnues comme exceptionnelles !

7. La cuisson

La cuisson conditionne avant tout la flaveur et la jutosité des viandes. C'est au cours de cette étape que la flaveur se développe. Ceci notamment grâce à la réaction de Maillard et à la dégradation des lipides, des triglycérides et des phospholipides qui vont générer des composés aromatiques. Les conditions de cuisson (atmosphère sèche ou humide), la température et la durée du traitement thermique s'avèrent importantes car elles modifient la nature et la concentration des composés aromatiques 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 de la viande mais également à son assèchement, notamment en lien avec la composante myofibrillaire et collagénique du muscle [McCormick, 2009]. Une durée trop longue et une température de cuisson trop élevée peuvent conduire à des viandes peu juteuses [Tornberg, 2005]. Dans le cas de cuisson en atmosphère humide, la température de l'eau est également primordiale. Une viande sera d'autant plus juteuse que l'eau dans laquelle elle a été plongée est chaude, son aptitude à garder les sucs étant améliorée. La cuisson est également importante pour la tendreté de la viande. En effet, selon la teneur en collagène du muscle, le mode de cuisson doit varier. Les muscles pauvres en collagène nécessitent généralement une cuisson modérée, rapide et en milieu sec afin de préserver la tendreté, alors que les muscles qui présentent des teneurs élevées en collagène nécessitent une cuisson préférentiellement en atmosphère humide et de longue durée, afin de permettre au collagène de se gélifier et donc à la viande de s'attendrir [Moevi, 2003].

À retenir…

• *Le muscle strié squelettique est un tissu composite complexe et constitue le tissu précurseur de la viande*

• *Sa composition et ses propriétés contractiles et métaboliques sont reliées au déterminisme des qualités sensorielles (tendreté, jutosité, flaveur et couleur)*

• *Les caractéristiques des animaux (âge, sexe, race), leur génotype, les conditions d'élevage et d'abattage peuvent également influencer les qualités sensorielles de la viande bovine*

• *De nombreux autres facteurs induisent des modifications des caractéristiques biologiques du muscle et par conséquent des variations des qualités sensorielles (facteurs technologiques post-mortem, systèmes protéolytiques, conditions de conservation et de maturation de la viande…)*

• *La tendreté est la qualité sensorielle la plus recherchée par les consommateurs ; sa variabilité ne peut être expliquée que dans une moindre mesure par les caractéristiques biologiques du muscle (environ 1/3 à 1/4)*

• *L'identification de nouveaux indicateurs constitue une priorité de recherche pour espérer maîtriser et piloter les qualités sensorielles de la viande bovine. Ces indicateurs peuvent également permettre d'approfondir les connaissances sur les mécanismes qui régissent le déterminisme des qualités sensorielles de la viande bovine, et notamment celui de la tendreté*

Synthèse bibliographique

Chapitre 2 : Les biomarqueurs au service de la qualité de la viande bovine

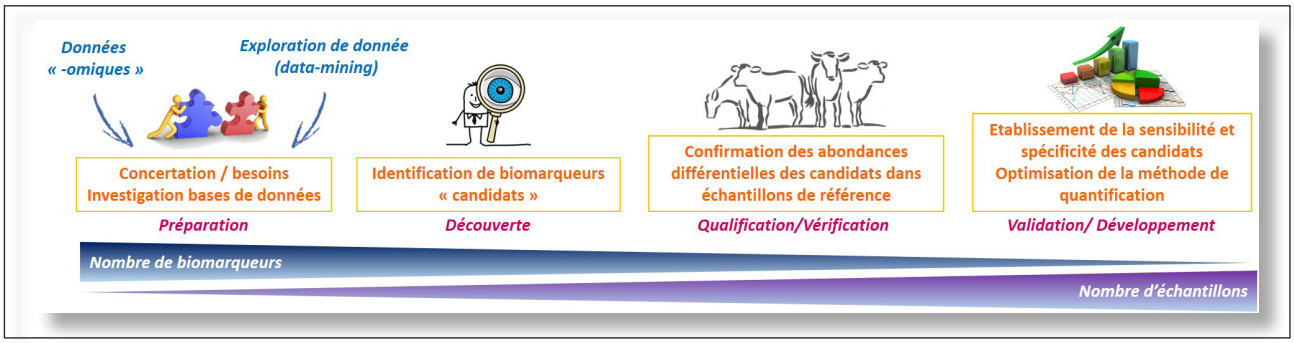


Figure 27. Stratégie à suivre pour le développement de nouveaux biomarqueurs protéiques
Adapté de [Rifai et al., 2016]

Chapitre 2 : Les biomarqueurs au service de la qualité de la viande bovine

Selon le National Institute of Health (USA), les biomarqueurs peuvent être définis comme des indicateurs biologiques qui permettent de caractériser un phénotype, ce dernier étant associé à un état physio-pathologique particulier (ou à une réponse pharmacologique) [Biomarkers Definitions Working Group., 2001].

I. Démarches pour l'identification de biomarqueurs

Avant de débuter une recherche de biomarqueurs, une phase de préparation au cours de laquelle une concertation avec l'ensemble des acteurs impliqués (industriels, médecins, sélectionneurs…) est réalisée pour identifier les objectifs et les intérêts potentiels que pourraient avoir ces biomarqueurs. Il s'agit ensuite de réaliser des investigations préliminaires, afin d'identifier l'existence de biomarqueurs préexistants ou potentiels qui pourraient répondre à l'objectif. Le cas échéant, le processus d'identification pourra être poursuivi en développant une démarche scientifique adaptée. Avant d'être validés et utilisés en routine, que ce soit en biologie humaine, en clinique ou pour l'industrie agro-alimentaire et les filières, les biomarqueurs doivent être soumis à un processus multi-étapes comprenant une découverte, une phase de qualification, une phase de vérification et une phase de validation et de développement [Te Pas et al., 2011; Rifai et al., 2006] **(Figure 27)**. L'ensemble de ces étapes sera décrit pour la filière viande.

1. La phase de découverte et d'identification

La plupart des travaux de recherche qui sont conduits sur du matériel biologique aspire à maximiser la détection de protéines différentielles tout en réduisant au maximum le nombre d'échantillons requis pour l'analyse. Ainsi, les études sont généralement menées sur des groupes d'individus qui présentent des caractéristiques contrastées pour le caractère d'intérêt. Pour la recherche de biomarqueurs prédictifs de la tendreté de la viande bovine, deux groupes réduits d'individus « extrêmes » pour le caractère « tendreté » seraient analysés pour identifier les protéines différentielles. Plusieurs types de tissus ou bio-fluides de référence peuvent être utilisés pour la découverte de nouveaux marqueurs (ex : biopsies musculaire, sang, urine, salive…). Depuis les années 1950, le sang est le fluide privilégié pour la recherche de biomarqueurs en médecine clinique. En effet, les protéines plasmatiques qui permettent de fournir un

aperçu de l'état physio-pathologique d'un individu, font l'objet des tests couramment utilisés en routine [Burtis et al., 2012]. Cependant, bien que ce soit le matériel préféré pour les études diagnostic, la découverte de biomarqueurs protéiques d'origine plasmatique est complexifiée par la faible abondance relative attendue des marqueurs spécifiques du caractère d'intérêt. En effet, généralement issus de tissus, ces derniers sont excrétés par fuite ou sécrétion et sont par conséquent extrêmement dilués dans la circulation sanguine. Cela implique d'utiliser une stratégie particulière afin d'éliminer les protéines majoritaires pour limiter les interférences lors de l'analyse en MS, mais aussi pour pouvoir identifier les protéines minoritaires, potentielles protéines candidates. Ainsi un fractionnement des échantillons peut être réalisé afin de cibler les protéines minoritaires ; cependant cette stratégie de traitement des échantillons, très chronophage et coûteuse, limite considérablement le nombre d'échantillons à analyser. Ainsi, lorsque cela est possible, il est plus aisé de rechercher des biomarqueurs candidats hors des tissus. En effet, lors de la phase de découverte, le principal objectif reste d'augmenter au maximum le nombre de candidats reliés à la variabilité du caractère. La nature de l'échantillon doit être choisie pour favoriser le « rendement » des biomarqueurs candidats sur un maximum d'échantillons. La découverte de nouveaux biomarqueurs consiste donc à trouver le compromis entre la nécessité d'utiliser un bio-fluide ou tissu particulier, et le besoin d'identifier une liste de biomarqueurs candidats la plus exhaustive possible sur un grand nombre d'échantillons.

Bien que des techniques basées sur l'électrophorèse aient été utilisées antérieurement, la technologie moderne la plus adaptée à la découverte de biomarqueurs protéiques reste la spectrométrie de masse (MS). Comme nous allons le voir dans la suite de ce chapitre, les spectromètres de masse, indépendamment de leur type, mode d'ionisation ou caractéristiques de performances, génèrent des spectres de masse relatifs au rapport masse/charge des fragments protéiques protéolysés (axe des x) par rapport à l'abondance de ces fragments dans l'échantillon (axe des y). Toutefois, pour qu'un fragment protéique (ou protéine) soit identifié comme « biomarqueur candidat », il faut que la variation de son abondance soit constante en fonction du caractère d'intérêt, mais aussi que la différence d'abondance soit significative entre les deux états de ce caractère. Dans le cadre d'une recherche sur la tendreté, l'abondance de la protéine candidate devra être constante au sein des groupes extrêmes tendre et dur pris séparément, mais cette abondance devra être significativement différente entre le groupe tendre et le groupe dur.

2. La phase de qualification et de vérification

Quel que-soit le domaine d'étude, la recherche de biomarqueurs s'est largement développée ces dernières années. Bon nombre de protéines « candidates » ont été identifiées, cependant la plupart des études ne décrivent que l'association de ces candidats avec le caractère d'intérêt et ne vont pas plus loin. Or, le point critique dans le développement des biomarqueurs réside dans le choix du (ou des) candidat(s) à « qualifier » et à « valider ».

La qualification correspond aux matériels et méthodes de la phase de « découverte » qui ont été optimisés. Ils seront utilisés pour la phase de « vérification ». La « qualification » comprend deux composantes plutôt discordantes : (i) en supposant que le test sanguin est finalement prévu, la qualification exige que le différentiel protéique ait été démontré. Cette composante de la « qualification » n'est pas nécessaire si le tissu ou fluide initialement ciblé lors de la phase de découverte est identique au tissu ou fluide prévu pour être utilisé comme fluide de référence pour le diagnostic final. (ii) La seconde composante requiert que l'expression différentielle puisse être détectable par l'analyse qui sera employée pour la vérification. Cette analyse pourra être différente de celle utilisée pour la phase de « découverte ».

La vérification est une étape importante dans le développement de biomarqueurs. Tous les biomarqueurs candidats identifiés au cours de la phase de « découverte » doivent faire l'objet d'une « vérification ». En fonction de la rigueur de la phase de « découverte » et du nombre de candidats identifiés, la « vérification » doit être conduite sur un sous-ensemble de candidats qualifiés. Dans ce cas, les connaissances biologiques des biomarqueurs, leur facilité de quantification (observée au cours de la phase de qualification) et la disponibilité des réactifs au laboratoire sont souvent utilisés pour identifier une liste réduite de candidats à valider. Les méthodes optimisées de la phase de « découverte » seront utilisées pour la phase de « vérification ». La « vérification » est conduite sur une sous-population d'échantillons représentatifs de la population dans laquelle le test diagnostic final sera développé. Ainsi, la « vérification » réintroduit la variation qui a été minimisée dans la phase de « découverte » et la « qualification ». Cette phase peut être considérée comme une phase de « pré-validation » car elle est conduite sur un effectif restreint de l'ordre d'une centaine d'échantillons, et en général avec une méthodologie moins optimisée que celle qui sera utilisée pour la « validation ». À l'issue de la « vérification », un petit nombre de candidats hautement qualifiés seront identifiés pour être soumis à la phase de validation externe [Sauvant et al., 2019].

3. La phase de validation et de développement

Au cours de ces phases de « validation » et de « développement », les candidats qualifiés et validés sont mesurés sur des milliers d'échantillons. Au cours de la phase de « validation », une modification de la méthode de détection est à cette étape nécessaire. En effet, la spectrométrie de masse, qui n'est pas adaptée pour réaliser des mesures haut-débit de haute précision, n'est pas couramment acceptée comme méthodologie d'essai de validation par la US Food and Drug Administration (FDA) [Kingsmore, 2006]. En effet, en supposant que la protéine ait une concentration plasmatique dans la gamme du picogramme (pg) au nanogramme (ng)/ml, la sensibilité des techniques immunologiques (Dosage radio-immunologique (RIA), ELISA) devra être privilégiée. Ces techniques offrent un niveau de sensibilité plus élevé par rapport à des technologies non-immunologiques plus sophistiquées telle que la chromatographie liquide LC-MS/MS (décrite dans la suite de ce chapitre). De plus, ce sont des techniques de routine utilisées en recherche et développement clinique en laboratoire [Vitzthum et al., 2005]. Après l'obtention d'une liste de biomarqueurs potentiels, la phase de « validation » va consister à (i) déterminer statistiquement la fiabilité et la robustesse du biomarqueur, puis à (ii) réaliser une validation interne sur un plus large panel d'individus. Le « développement », ou « essai clinique » dans le domaine médical, consiste à réaliser « une validation externe » nécessitant un nouveau lot d'échantillons indépendants des échantillons utilisés pour les phases précédentes (individus moins contrastés). Comme indiqué précédemment, les biomarqueurs protéiques ont un objectif diagnostic ou prédictif d'un état physio-pathologique ou d'un caractère d'intérêt agronomique [Vitzthum et al., 2005; Picard and Gagaoua, 2020]. Le « développement » d'un biomarqueur nécessite l'évaluation de sa spécificité et de sa sensibilité. Une représentation graphique du « ratio de pertinence clinique » (ou « Receiver-operating characteristic » ROC), calculé à partir de ces deux valeurs, pourra permettre d'augmenter la certitude du caractère « diagnostic » ou « prédictif » des biomarqueurs [Bossuyt et al., 2003 ; Albert, 1982 ; Zweig and Campbell, 1993]. Ce ROC permet d'évaluer la capacité d'un biomarqueur à prédire ou diagnostiquer la présence ou l'absence d'un caractère d'intérêt (ou d'une maladie). À l'issue de cette phase, les biomarqueurs sélectionnés pourront être utilisés pour prédire les mécanismes biologiques identifiés et intégrés dans des outils de phénotypage par exemple.

Figure 28. **Principaux éléments d'un spectromètre de masse**

II. Les biomarqueurs et la qualité de la viande

L'identification de biomarqueurs adaptée à l'étude des qualités sensorielles présente un intérêt particulier pour permettre une meilleure compréhension des mécanismes de transformation du muscle en viande, mais également des mécanismes complexes qui régissent la tendreté et sa forte variabilité. Les biomarqueurs présentent également un intérêt fort pour les programmes de sélection génétique, pour prédire l'évolution et la mise en place de la qualité, mais aussi la gestion et la classification des carcasses en fonction de la qualité de la viande et non plus de la conformation de la carcasse [Gagaoua et al., 2015c].

1. La stratégie protéomique

Introduit en 1996, le terme « protéomique » peut être décrit comme l'étude globale de l'expression protéique d'une cellule ou d'un organisme dans des conditions données et à un moment donné [Wilkins et al., 1996]. Complémentaire de la génomique qui concerne l'étude de l'expression des gènes, le protéome, ensemble des produits finaux d'expression des gènes, est plus représentatif de la fonction d'une cellule que le gène lui-même. Contrairement au génome qui est identique dans la plupart des cellules, l'analyse protéomique est très dynamique selon le contexte et le stade de développement de la cellule [Horvatovich et al., 2014]. De plus, les protéines peuvent subir des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, glycosylation, oxydation, ubiquitination…). Ces modifications, nécessaires aux mécanismes de régulation et de signalisations cellulaires, ne peuvent être étudiées que par l'analyse protéomique, mais elles complexifient l'étude du protéome. Ainsi, contrairement à l'analyse génomique qui consiste à identifier environ 22 000 gènes chez le bovin [Elsik et al., 2009], la complexité du protéome permet d'estimer à près de 10 000 à 30 000, dont plus de 400 isoformes, le nombre de protéines présent dans chaque tissu. La préparation des échantillons, ainsi que la séparation, l'identification et la quantification des protéines nécessitent l'utilisation de technologies spécifiques [Bendixen, 2005, 2013 ; Mullen et al., 2009], notamment basées sur de l'électrophorèse sur gel couplée à la spectrométrie de masse.

La spectrométrie de masse est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse et de caractériser leur structure chimique. Le principe de la spectrométrie réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ou ions) en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z). Différents spectres de masse sont développés en fonction de leur 3 éléments majeurs : la source d'ionisation, l'analyseur et le détecteur **(Figure 28)** :

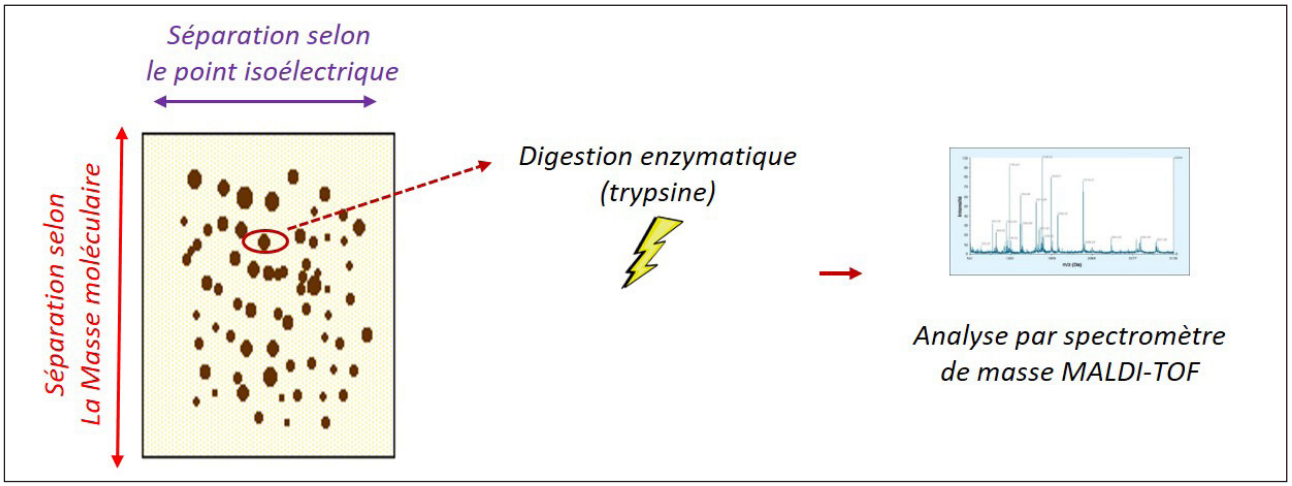


Figure 29. **Principe de l'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE) associée à la spectrométrie de masse**

Méthode de révélation	Méthode de détection	Limite de détection	Gamme de linéarité
Bleu de Coomassie	Colorimétrie	10-100 ng	1-3
Nitrate d'argent	Colorimétrie	1 ng	Pas de linéarité
Cyanines	fluorescence	0,1 ng	3-5

Tableau 2. **Caractéristiques des méthodes de révélation des gels électrophorèses bidimensionnelles (2-DE)**

• **La source ionique** qui vaporise et ionise les molécules. En fonction des objectifs recherchés, plusieurs sources ioniques peuvent être utilisées.

• **L'analyseur** qui sépare les ions en fonction de leur rapport m/z. Certains analyseurs peuvent être couplés entre eux pour générer des identifications protéiques en tandem (ou MS/MS). Dans ce cas, le premier analyseur sépare les ions, une cellule intermédiaire (dite « cellule de collision ») permet de fragmenter les ions, le deuxième analyseur sépare les ions fragments.

• **Le détecteur** qui collecte les ions en fonction de leur rapport m/z, amplifie le signal et génère un signal spectral (ou « spectre de masse »). Chaque spectre caractérise un fragment, son rapport m/z et son abondance dans l'échantillon.

Les stratégies protéomiques développées peuvent être décrites selon deux grandes approches telles que : **L'approche « *top-down* »** permet l'analyse des peptides plus longs ou des protéines intactes. Elle présente un intérêt particulier car elle permet une caractérisation plus complète des isoformes de protéines et des modifications post-traductionnelles. L'électrophorèse bidimensionnelle sur gel (2-DE) répondant à cette approche était la plus communément utilisée. Cette technique permet de séparer environ 2000 protéines sur la base de leur point isoélectrique et de leur poids moléculaire (PM) **(Figure 29)** [Vercauteren et al., 2007 ; O'Farrell, 1975] et permet d'observer la présence de certaines isoformes ou de certaines modifications post-traductionnelles [Rabilloud et al., 2010]. Après la séparation des protéines et leur coloration, plusieurs types de systèmes de révélation peuvent être utilisés afin de quantifier les spots protéiques des échantillons. En fonction des systèmes de révélation utilisés (Bleu de Coomassie, Nitrate d'argent ou fluorescence), la sensibilité de détection et la gamme de linéarité quantitative seront différentes **(Tableau 2)**. Des avancées réalisées avec le système de révélation à fluorescence ont permis de développer l'électrophorèse différentielle (ou DIGE pour l'anglais « Difference gel electrophoresis »), qui présente l'avantage de pouvoir séparer deux échantillons sur le même gel en révélant respectivement les différents spots protéiques par des marquages spécifiques et distincts. Ce système améliore grandement la reproductibilité qui fait souvent défaut aux techniques classiques sur gel [Marouga et al., 2005]. Cependant, l'analyse 2-DE présente des limites, notamment du fait de la co-migration de certaines protéines et du faible pouvoir de résolution. De plus, les protéines de faible abondance ne sont pas toujours bien révélées par les marquages [Gygi et al., 2000], et ce type d'analyse ne permet de quantifier que les protéines fortement abondantes dans les échantillons complexes

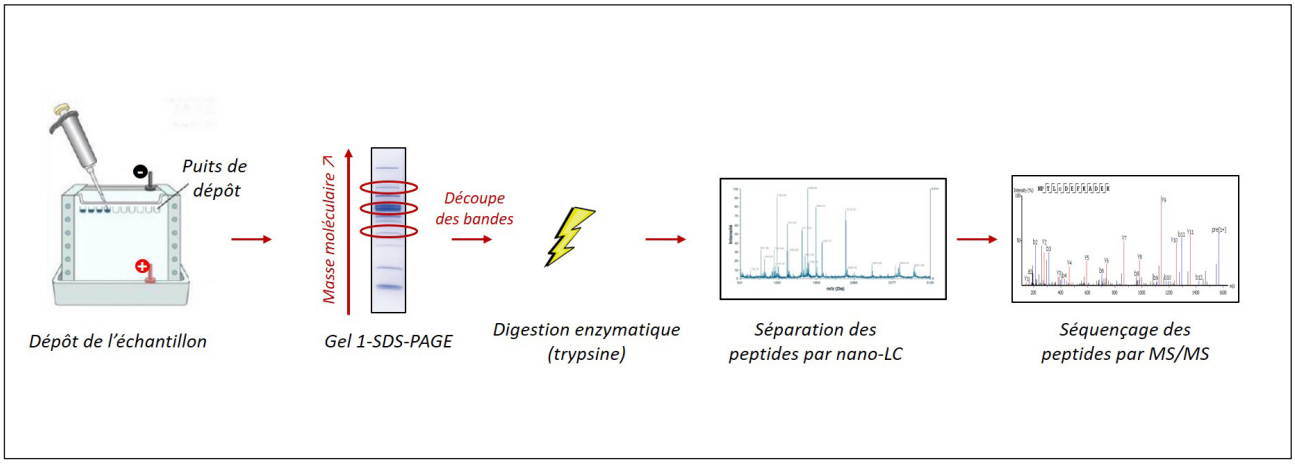


Figure 30. Principe du de l'électrophorèse 1D-SDS-PAGE couplée à la nano-chromatographie liquide (nano-LC-MS/MS)

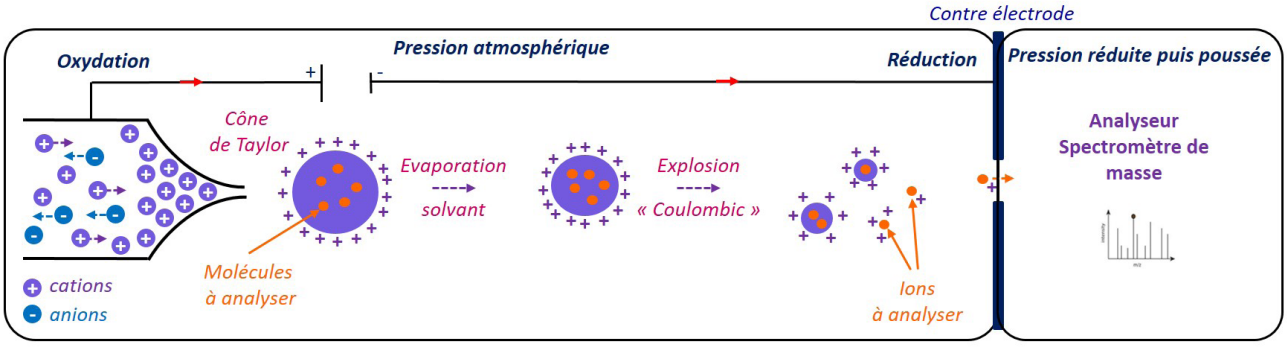


Figure 31. Représentation schématique du principe de l'ionisation electrospray

Les spectromètres de masse à ionisation par électro-pulvérisation (MS ESI) utilisent une technique d'ionisation dite «douce» qui a été largement utilisée en spectrométrie de masse biologique et notamment en protéomique. Dans un spectromètre de masse à ionisation par électrospray, les molécules à analyser (ex : protéines) passent dans le spectromètre de masse sous forme de fine pulvérisation, généralement après une séparation chromatographique, que ce soit par chromatographie liquide traditionnelle, HPLC ou nano-LC. Lorsque le jet émerge de la source ESI, les molécules sont ionisées par la pointe chargée électriquement de la buse. Au fur et à mesure que ce brouillard se déplace et s'évapore, la répulsion électrostatique entre les ions de même charge force les fragments peptidiques à se séparer. Ils peuvent ensuite être analysés par une grande variété d'analyseurs de masse

Adapté de [Kebarle and al., 2000]

[Susanne K. Pedersen et al., 2003]. Ainsi, l'analyse d'échantillons complexes nécessite de réaliser un préfractionnement afin de pouvoir quantifier les protéines faiblement abondantes [Görg et al., 2002].

Les techniques à base de gel ont permis de faire émerger de nouvelles technologies basées sur l'utilisation de la spectrométrie de masse [O'Farrell, 1975 ; Görg et al., 2004]. Ces techniques présentent une haute sensibilité et une haute résolution. Elles consistent à réaliser au préalable une digestion enzymatique des spots protéiques pour générer des peptides qui seront identifiés en MS par empreinte peptidique massique, ou en MS/MS par séquençage peptidique **(Figure 30)**.

Cependant le couplage 2-DE et MS est une méthode lente et coûteuse et elle ne permet pas la séparation des protéines aux propriétés physico-chimiques « extrêmes » (hautement acides, basiques ou hydrophobes, de petite taille (<7kDa) ou de grande taille (>200kDa)).

Une alternative à la technologie 2-DE consiste à séparer et identifier les protéines en couplant le SDS-PAGE à la nano-chromatographie liquide en phase inverse **(Figure 31)**. La première étape permet de séparer les protéines sur un gel SDS-PAGE, en fonction de leur masse moléculaire. Une digestion enzymatique à la trypsine va ensuite être réalisée, afin de générer des peptides qui pourront être séparés en fonction de leur hydrophobicité par nano-LC sur nano-colonne de phase inverse de type C18. Les fragments protéiques seront ensuite introduits dans un spectromètre de masse pour analyse et identification en MS/MS. Le couplage nano-LC à la MS [Cappiello et al., 2005] en fait une méthode de choix pour l'analyse du protéome à haut-débit [Bendixen, 2005, 2013 ; Mullen et al., 2009]. En effet, le couplage de ces deux technologies permet un traitement automatisé au travers de l'injection directe dans le spectromètre de masse des peptides élués de la nano-colonne. L'accumulation de données spectrales ne permet pas à elle seule d'identifier les protéines de l'échantillon. En effet, les spectres doivent être traités afin d'identifier les protéines d'où les peptides tryptiques sont issus en interrogeant les banques de données (approche dite « *bottom-up* »). Cette approche utilise une série d'identification de fragments de protéines qui apportent chacun une information spécifique pour l'identification et la caractérisation globale de protéines. Si le génome étudié est disponible dans les banques de données protéiques, l'approche « peptides mass Fingerprinting » ou empreinte peptidiques massive sera envisagée. Cependant, si l'organisme n'est pas référencé une analyse MS/MS permettant d'obtenir une partie de la séquence des peptides analysés sera favorisée.

Approches	Objectifs	Références
1-DE	Relationship between myofibrillar 1D protein patterns of *Longissimus* muscle with tenderness Beef tenderness prediction using separated myofibrillar 1D protein bands	Sawdy et al. (2004) Zapata et al. (2009)
DIGE	Assess the changes in the myosin light chains of *Longissimus* myofibril proteins during *p-m* aging Identification of protein markers of meat tenderness in *Longissimus* muscle	Muroya et al. (2007) Jia et al. (2009) Anderson et al. (2012)
iTRAQ	Explore the basis of meat variation in tenderness by studying the changes in protein abundances Identification of the differentially expressed proteins involved in intramuscular fat deposition	Bjarnadottir et al. (2012) Mao et al. (2016)
MALDI-TOF	Mapping of bovine *Semitendinosus* muscle of Charolais cattle Changes of meat quality in *Longissimus* muscle following water bath and ohmic cooking	Bouley et al. (2004) Tian et al. (2016)
LC-ESI/MS	Identification of early predictors of meat eating qualities of the Blonde d'Aquitaine bulls Separation and identification of the potential proteins explaining the variability of beef tenderness	Morzel et al. (2008) Baldassini et al. (2015)
LC-MS/MS	Relationship between changes in *p-m* degradation of myofibrillar proteins and tenderness development Phosphorylation of sarcoplasmic and myofibrillar proteins in response to *p-m* electrical stimulation Explore the proteome changes in the *Longissimus* muscle in response to preslaughter stress	Marino et al. (2015) Li et al. (2015) Franco et al. (2015)
nLC-MS/MS	Explore the effect of high pressure on skeletal muscle proteome and the induced changes Occurrence of low MW peptides in the *Pectoralis* muscle during aging and cooking	Marcos and Mullen (2014) Bauchart et al. (2006)
LESA-MS	Analysis of skeletal muscle proteins derived from a mixture of standard proteins and raw meat	Montowska et al. (2014)

Tableau 3. Résumé des techniques utilisées pour les études protéomiques menées chez le bovin
Electrophorèse unidimensionnelle (1-DE). Electrophorèse différentielle (DIGE). Marquage isobarique pour quantification relative et absolue (iTRAQ). Chromatographie liquide par electrospray couplé à la spectrométrie de masse (LC-ESI/MS). Spectrométrie de masse avec analyse de surface par extraction de liquide (LESA-MS). Désorption-ionisation laser assistée par matrice couplé à la spectrométrie de masse (MALDI-TOF), matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-time-of-flight; nLC-MS/MS, nanoliquid chromatography-tandem mass spectrometry.

2. De la protéomique à la découverte de biomarqueurs de tendreté

Depuis les années 2000, les technologies protéomiques ont permis de cartographier avec succès des protéines musculaires [Bouley et al., 2004a] associées à des caractéristiques musculaires telles que l'hypertrophie musculaire [Ge et al., 2003 ; Bouley et al., 2005], à la physiologie musculaire [Isfort et al., 2002], mais aussi à la couleur de la viande [Naveena et al., 2010 ; Joseph et al., 2012 ; Gagaoua et al., 2017] et à la texture de la viande [Kiran et al., 2015] **(Tableau 3)**. Les priorités de recherche visaient principalement à caractériser les qualités et les mécanismes de transformation de la viande, afin de prévoir la qualité du produit final. De nombreuses études utilisent la protéomique musculaire pour identifier des protéines biomarqueurs reliées à des caractères d'intérêts agronomiques, notamment les qualités de la viande. Ces études ont pour objectif de développer des outils prédictifs simples, efficaces et le moins dépréciatifs pour la carcasse des animaux. Bien que les processus biologiques qui contrôlent la qualité de la viande soient connus et qu'un certain nombre de Quantitative Trait Loci (QTL) aient été identifiés, le contrôle de la variabilité de la tendreté reste un défi majeur pour la filière de la viande bovine.

Dans un contexte où le protéome des animaux est modifié au cours de la vie de l'animal, mais aussi influencé par les facteurs génétiques et par l'environnement, l'analyse du protéome des animaux de rente permet d'étudier les variations des niveaux d'abondance des protéines en fonction du temps, de l'environnement, des conditions de production et d'abattage, de l'état physio-pathologique, de l'espèce, de la race et des conditions de maturation et de cuisson [Picard et al., 2018, 2019]. Elle permet également une meilleure compréhension des mécanismes de contrôle de l'expression génétique [Anderson and Anderson, 1998]. Comme nous allons le voir dans la suite de ce manuscrit, la protéomique a été une technique de choix pour appréhender les facteurs influençant les qualités de la viande, notamment au travers des modifications *post-mortem* du protéome, elles-mêmes influencées par la variabilité génétique des animaux. Nous traiterons principalement de la tendreté dans la suite de ce chapitre. Plusieurs revues de synthèse [Guillemin et al., 2009b ; Picard and Gagaoua, 2017a, 2019] ont résumé les connaissances actuelles sur les marqueurs biologiques de la tendreté de la viande bovine identifiés à ce jour. Une liste non-exhaustive des biomarqueurs protéiques identifiés par analyse protéomique et associés à la tendreté de la viande bovine est présentée dans le **Tableau 4**.

Biomarqueurs protéiques (ID Gene Name)	Evaluation de la tendreté	Sens de la relation	Références
		Structure	
Myosin light chain 1 (*MLC1*)	WBSF	+	Bjarnadottir et al. (2012)
		-	Jia et al. (2009)
		+/−	Polati et al. (2012)
Myosin light chain 2 (*MLC2*)	WBSF	+	Zapata et al. (2009)
		−	Bjarnadottir et al. (2012)
		+/−	Polati et al. (2012)
Troponin C (TNNC)	WBSF	+	Zapata et al. (2009)
Troponin T (TNNT)	WBSF	+	Polati et al. (2012)
Myosin heavy chain 1 (MHC1)	WBSF	−	Zapata et al. (2009)
		−	Guillemin et al. (2011)
		+/−	Polati et al. (2012)
Myosin heavy chain 2 (MHC2)	WBSF	−	Zapata et al. (2009)
Myosin heavy chain 7 (MHC7)	WBSF	−	Zapata et al. (2009)
		+	Guillemin et al. (2011)
Desmin	WBSF	−	Zapata et al. (2009)
		−	Guillemin et al. (2011)
Tubulin β	WBSF	−	Zapata et al. (2009)
CapZ-β		*/**	Bjarnadottir et al. (2010)
α-actin (ACTA)	WBSF	−	Zapata et al. (2009)
	WBSF	+	Bjarnadottir et al. (2012)
	WBSF	+/−	Polati et al. (2012)
		+	Morzel et al. (2008)
Myosin binding protein-H (MBP-H)	WBSF	+	Guillemin et al. (2011)
	Tendreté sensorielle	+	Morzel et al. (2008)
		Protéolyse	
μ-calpain	Tendreté sensorielle	−	Guillemin et al. (2011)
	WBSF	+/−	Picard et al. (2014)
m-calpain	Tendreté sensorielle	−	Guillemin et al. (2011)
		Transport et signalisation	
Serum albumin	WBSF	−	Laville et al. (2009)
Serotransferrin	WBSF	+	Bjarnadottir et al. (2012)
Parvalbumin	Tendreté sensorielle	+	Bouley et al. (2004b)
Myoglobin	WBSF	+/−	Polati et al. (2012)
Fatty acid-binding protein (*FABP*)	WBSF	+/−	Polati et al. (2012)
		Apoptose	
Annexine A6	WBSF	+	Bjarnadottir et al. (2012)
Galectin-1	WBSF	+	Bjarnadottir et al. (2012)
Inositol 1,4,5-triphosphate receptor type 1 (IP3R1)	WBSF	+	Kim et al. (2008)

a) Les protéines du cytosquelette et protéolyse

Grâce à la protéomique, l'étude et l'identification des protéiques du cytosquelette est devenue possible [Lametsch et al., 2003]. Parmi les protéines structurelles identifiées, l'α-actine [Picard et al., 2014 ; Grabež et al., 2015 ; Bjarnadóttir et al., 2012 ; Chaze et al., 2013] est retrouvée plus abondante dans les groupes de muscles tendres *Longissimus* issus de jeunes bovins mâles de trois races françaises [Chaze et al., 2013]. Les auteurs ont également identifié une autre protéine de structure, la protéine Cap-Z β qui présente une abondance plus élevée dans le groupe tendre également. [Laville et al., 2009] ont identifié la surexpression d'un fragment d'actine de 31 kDa dans des viandes tendres par rapport à des viandes dures de jeunes bovins mâles Charolais. [Ouali et al., 2013] ont suggéré l'α-actine, un constituant majeur de l'appareil contractile du tissu musculaire, comme un bon marqueur de l'apoptose *post-mortem* ; [Bjarnadóttir et al., 2010] ont montré qu'elle était modulée durant la maturation. L'abondance de l'α-actine (pleine longueur) a également été observée comme diminuée dans les groupes tendres par des analyses de iTRAQ et de 2-DE [Kim et al., 2008 ; Laville et al., 2009 ; Bjarnadóttir et al., 2010]. Elle a également été rapportée comme présente dans une moindre mesure dans des muscles bovins à 36h post-mortem et corrélés avec la WB à 72h *post-mortem* [Zapata et al., 2009].

[Chaze et al., 2013] ont démontré une diminution des abondances en isoformes rapides de troponine (TNNT) dans des groupes de *Longissimus* tendres de trois races françaises. Ceci a également été observé pour le muscle *Longissimus* [Jia et al., 2006b, 2007]. La fragmentation de la chaîne lourde de myosine (MyHC) a été montrée comme corrélée positivement avec la tendreté de la viande à 7 jours *post-mortem* [Sawdy et al., 2004]. Les deux chaînes légères de myosine (MLC1 et MLC2) ont également été décrites comme étroitement reliées à la tendreté de la viande [Zapata et al., 2009 ; Jia et al., 2009]. [Bjarnadóttir et al., 2012] ont rapporté MLC1 comme plus abondante dans des échantillons de biopsie musculaires issus de groupes tendres, alors que MLC2 a été rapportée comme moins abondante dans ces mêmes échantillons. La corrélation entre la myosine MyHC-I (MYH7), la myosine MyHC-IIx (MYH1) et la tendreté est spécifique du type métabolique du muscle. En effet, les myosines MYHC-rapides sont positivement corrélées avec la tendreté, et les myosines MYHC-lentes sont négativement corrélées dans le *Semitendinosus* (rapide glycolytique), alors que l'inverse est observé dans le *Longissimus* (rapide oxydo-glycolytique)[Picard et al., 2014]. [Anderson et al., 2012] ont également rapporté des protéines de structure comme reliées à la tendreté entre des muscles tendres (*Longissimus*) et durs (*Adductor*). Parmi ces protéines,

Biomarqueurs protéiques (ID Gene Name)	Evaluation de la tendreté	Sens de la relation	Références
Métabolisme énergétique du muscle (Glycolytique)			
Enolase 1 (*ENO1*)	WBSF	*	Polati et al. (2012)
		–	D'Alessandro et al. (2012b)
Enolase 3 (*ENO3*	WBSF	–	Bjarnadottir et al. (2012)
		+	Guillemin et al. (2011)
		*	Polati et al. (2012)
		+/–	Marino et al. (2014)
Malate déshydrogénase 1 (MDH1)	WBSF	–	Jia et al. (2009)
Triosephosphate isomérase 1 (*TPI1*)	WBSF	–	D'Alessandro et al. (2012b)
		–	Grabez et al. (2015)
Glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase (*GAPDH*)	WBSF	**	Polati et al. (2012)
		+	Laville et al. (2009)
		–	D'Alessandro et al. (2012a)
		**	Marino et al. (2014)
Lactate dehydrogenase A (*LDHA*)	WBSF	*	Polati et al. (2012)
		*/+	Baldassini et al. (2015)
Pyruvate kinase (*PKM*)	WBSF	+	Baldassini et al. (2015)
		–	Laville et al. (2009)
Phosphoglucomutase 1 (*PGM1*)	WBSF	–	D'Alessandro et al. (2012b)
Métabolisme énergétique du muscle (Oxydatif)			
Aldéhyde déshydrogénase (*ALDH2*)	WBSF	–	Grabez et al. (2015)
		*/**	Jia et al. (2007)
Créatine kinase M type (*CKM*)	WBSF	–	Zapata et al. (2009)
		–	Bjarnadottir et al. (2012)
		*/**	Polati et al. (2012)
		–	Laville et al. (2009)
		–	D'Alessandro et al. (2012a)
Succinate déshydrogénase (*SDH*)	Tendreté sensorielle	+	Morzel et al. (2008)
Pyruvate déshydrogénase (*PDHB*)	WBSF	–	Grabez et al. (2015)

l'actine, des fragments de myosine (MYH1), la myomesin-2 (MYOM2) ou l'α-actinin 3 (ACTN3) ont été rapportées comme muscle spécifique durant les modifications *post-mortem*.

Comme nous avons pu le voir dans le chapitre précédent, les mécanismes enzymatiques qui sous-tendent la conversion du muscle en viande impliquent des activités enzymatiques endogènes en lien avec la protéolyse *post-mortem*. Ces systèmes protéolytiques incluant les calpaïnes, les cathepsines, le protéasome et plus récemment les caspases ont été largement étudiés [Sentandreu et al., 2002 ; Huff Lonergan et al., 2010]. Les isoformes ubiquitaires des protéases Ca^{2+} dépendantes, μ-calpaïne et m-calpaïne sont constituées de deux sous-unités catalytiques distinctes CAPN1 et CAPN2 codées respectivement par les gènes *Capn1* et *Capn2* [Goll et al., 2003]. Ces protéines sont connues pour interagir avec de nombreuses voies biologiques telles que l'homéostasie du Ca^{2+}, le cytosquelette musculaire, le métabolisme du glucose, les protéines HSP, la mitochondrie et l'apoptose, ce qui suggère leur implication dans les mécanismes de protéolyse *post-mortem* et dans la tendreté. En effet, un canal calcique exprimé au niveau de la membrane du réticulum sarcoplasmique, le récepteur de la Ryanodine (RYR1), impliqué dans la régulation de la sortie calcique du réticulum sarcoplasmique nécessaire à l'activation des unités contractiles, a été décrit comme potentiel substrat des calpaïnes [Brulé et al., 2010] et comme une cible des espèces oxygénées réactives [Lunardi et al., 2008]. Les protéines oxydées HSP70-1A/B ont également été décrites comme des substrats potentiels des calpaïnes [Gagaoua et al., 2015d]. Plusieurs partenaires des calpaïnes incluant l'ATP synthase-α, mitochondriale ou l'ACTN3 ont ainsi été rapportées comme biomarqueurs de la tendreté [Brulé et al., 2010]. La protéomique a permis de montrer que l'oxydation de la μ-calpaïne, par formation d'une liaison au disulfure intermoléculaire, était capable d'induire une perte de l'activité protéolytique. Ces résultats mettent en évidence l'influence négative de l'oxydation protéique sur la tendreté de la viande. De plus, des changements du protéome de myofibrilles purifiées ont été observés suite à une incubation *in vitro* avec de la CAPN1 durant 4 jours en conditions *post-mortem* simulées [Lametsch et al., 2004]. D'autres études de protéome musculaire bovin, axées sur les interactions protéines-protéines, ont permis d'identifier des partenaires des calpaïnes autres que les calpastatines (inhibiteurs de calpaïnes) [Guillemin et al., 2011]. Cette étude a également permis de montrer que la contribution de la protéolyse dans la tendreté était variable selon le muscle étudié. En effet, une corrélation positive entre CAPN1 et la tendreté et négative avec la CAPN2 ont été décrites pour le muscle *Semitendinosus*, alors que des corrélations inverses ont été observées dans le muscle *Longissimus* [Guillemin et al., 2011]. Ces résultats sont en accord avec les corrélations inverses observées entre certaines protéines contractiles et métaboliques et la tendreté décrites pour ces deux muscles [Picard et al., 2014].

Biomarqueurs protéiques (ID Gene Name)	Evaluation de la tendreté	Sens de la relation	Références
Protéines de choc thermique (HSP)			
HSP20 (*HSPB6*)	WBSF	+	Zapata et al. (2009)
		+	Guillemin et al. (2011)
		*	Polati et al. (2012)
		+/−	D'Alessandro et al. (2012a)
HSP27 (*HSPB1*)	WBSF	+	Kim et al. (2008)
	WBSF	*	Polati et al. (2012)
	WBSF	−	Carvalho et al. (2014)
	WBSF	−/**	D'Alessandro et al. (2012b)
	Tendreté sensorielle	+/−	Morzel et al. (2008)
αB-crystalline (*CRYAB*)	WBSF	+	Zapata et al. (2009)
	WBSF	−	Guillemin et al. (2011)
	WBSF	*	Polati et al. (2012)
	WBSF	**	D'Alessandro et al. (2012b)
	Tendreté sensorielle	+/−	Morzel et al. (2008)
HSP40 (*DNAJA1*)	Tendreté sensorielle	−	Bernard et al. (2007)
HSP71 (*HSPA8*)	WBSF	−	D'Alessandro et al. (2012b)
HSP70-1A (*HSPA1A*)	WBSF	+	Bjarnadottir et al. (2012)
		+	Carvalho et al. (2014)
		−	D'Alessandro et al. (2012b)
HSP70-1B (*HSPA1B*)	WBSF	+	Baldassini et al. (2015)
		−	D'Alessandro et al. (2012b)
HSPp70-GRP75 (*HSPA9*)	WBSF	+	Jia et al. (2009)
		−	Guillemin et al. (2011)
		−	Grabez et al. (2015)
Stress oxydant / Détoxification cellulaire			
DJ-1 (*PARK7*)	WBSF	+	Jia et al. (2009)
		*	Jia et al. (2007)
		*	Polati et al. (2012)
Peroxiredoxin 1 (*PRDX1*)	WBSF	*	Polati et al. (2012)
Peroxiredoxin 2 (*PRDX2*)	WBSF	*	Jia et al. (2007)
Peroxiredoxin 3 (*PRDX3*)	WBSF	*	Jia et al. (2007)
Peroxiredoxin 6 (*PRDX6*)	WBSF	−	Jia et al. (2009)
		+	Guillemin et al. (2011)
		+	Marino et al. (2014)
Superoxide dismutase (*SOD*)	WBSF	*	Marino et al. (2014)
		−	Grabez et al. (2015)
Carbonic anhydrase (*CA3*)	WBSF	**	Polati et al. (2012)

Tableau 4. Liste non-exhaustive des biomarqueurs protéiques identifiés par une approche protéomique et associés à la variabilité de la tendreté de la viande bovine.
Ces biomarqueurs ont été identifiés majoritairement à partir du muscle *Longissimus* issue de différentes espèces bouchères.

b) Les protéines du métabolisme énergétique

Plusieurs études traitant des changements *post-mortem* du muscle ont décrit des changements du métabolisme énergétique *post-mortem* par rapport au métabolisme de l'animal vivant [Jia et al., 2006a ; Laville et al., 2009 ; Bjarnadóttir et al., 2010]. Une comparaison de protéome de muscle *Longissimus* a permis d'identifier des protéines différentiellement abondantes entre des groupes extrêmes de tendreté. Il s'agit notamment de protéines en lien avec le métabolisme glycolytique : l'énolase 3 (ENO3), la malate déshydrogénase (MDH1), l'isomérase de triosephosphate (TPI1), la glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), la lactate déshydrogénase (LDHA), la pyruvate kinase (PKM) et la phosphoglucomutase (PGM1) **(Tableau 4)**. L'énolase 1 (ENO1) et l'énolase 3 (ENO3) sont deux isoformes qui catalysent la conversion du 2-phosphoglycérate en phosphoenolpyruvate pendant la glycolyse. L'ENO1 est une protéine ubiquitaire qui est omniprésente dans le cytoplasme cellulaire, alors que l'ENO3 est principalement présente dans le muscle squelettique. Leur corrélation avec la tendreté apparaît comme spécifique à l'isoforme 3, car seule l'ENO3 a été décrite comme corrélée avec la tendreté. En effet, [Jia et al., 2006b] ont montré une augmentation de l'ENO3 peu de temps après la mort. D'autres études ont montré une augmentation des fragments d'ENO3 après une période de maturation plus longue (>21 jours) indiquant un ralentissement du processus glycolytique [Laville et al., 2009]. Cette recherche a également mis en évidence une augmentation de la protéine PGM1 après 5 et 21 jours de maturation [Laville et al., 2009]. La protéine PGM1 catalyse la production de 3-phosphoglycérate et d'ATP à partir de 1.3-bisphosphoglycérate. Elle est retrouvée sous deux isoformes : l'une dont la concentration est fortement diminuée au cours des premières heures *post-mortem*, alors que l'autre est fortement augmentée après une maturation plus longue [Jia et al., 2006a, 2006b]. La protéine PKM est une enzyme impliquée dans la catalyse de la réaction de transfert d'un groupe phosphate de phosphoenolpyruvate à l'ATP en utilisant une molécule de pyruvate. Elle est retrouvée sous la forme de quatre isoenzymes dont les PKM1 et PKM2 qui sont prédominantes dans le muscle squelettique. Une isoforme de PKM2 a été décrite comme augmentée après une période post-mortem de 120 heures chez le bovin [Baldassini et al., 2015]. Cette augmentation de PKM2 a également été associée à une diminution de la tendreté dans une étude menée sur de la viande de poulet [Mekchay et al., 2010]. La relation entre le polymorphisme génique de PKM2 et la teneur en glycogène dans le muscle du porc a été associée à une augmentation importante de PKM2, mais aussi reliée à une modification du métabolisme glycolytique au début de la période *post-mortem* [Fontanesi et al., 2003]. La protéine TPI est une enzyme glycolytique qui catalyse la réaction réversible de la dihydroxyacétone phosphate (DHAP) en D-glycéraldéhyde-3-

phosphate (G3P). Elle a été décrite comme associée à la WBSF [D'Alessandro et al., 2012b ; Marino et al., 2014 ; Grabež et al., 2015]. La protéine TIP1 a également été proposée comme biomarqueur potentiel de dépôt de gras intramusculaire [Kim et al., 2008] et comme marqueur de défauts de coloration de la viande de bœuf durant le stockage *post-mortem* [Wu et al., 2016].

En terme de recherche de biomarqueurs, les protéines en lien avec le métabolisme oxydatif sont moins nombreuses que les protéines glycolytiques : l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH2), la créatine kinase M (CKM) et la succinate déshydrogénase (SDH). Ces protéines sont associées aux mitochondries et à la régénération de l'ATP [Ouali et al., 2013]. Dans les muscles striés, la protéine CKM est associée au transfert d'un groupe phosphate de phosphocréatine à ADP pour générer l'ATP. Plusieurs études ont rapporté une augmentation des fragments de CKM au cours de la maturation de la viande [Jia et al., 2007 ; Laville et al., 2009 ; Bjarnadóttir et al., 2010].[Chaze et al., 2013] ont décrit plusieurs protéines du métabolisme glycolytique comme reliées négativement à la tendreté du muscle *Longissimus thoracis* de jeunes bovins mâles de races Françaises, alors que plusieurs protéines du métabolisme oxydatif sont positivement reliés avec la tendreté. Ces résultats sont en accord avec les travaux de [Morzel et al., 2008 ; Picard et al., 2014] qui montrent une corrélation positive entre l'abondance de la protéine SDH et la tendreté dans le muscle *Longissimus thoracis*. Cependant, contrairement aux races françaises qui présentent un métabolisme plus glycolytique, des races au métabolisme très oxydatif comme la race Aberdeen Angus présentent des relations inversées [Picard et al., 2014]. Ces résultats étant en accord avec les travaux de [D'Alessandro et al., 2012a] qui montrent une corrélation positive entre les protéines du métabolisme glycolytique et la tendreté dans une race italienne très oxydative (Chianina). Il a également été montré que les viandes les plus tendres issues de jeunes bovins mâles charolais présentaient des fragments de membranes mitochondriales plus importants en début de période *post-mortem*. Ces observations suggèrent une dégradation importante de la membrane mitochondriale dans les muscles lents oxydatifs. Les mitochondries jouent un rôle central dans le processus apoptotique et de nombreuses protéines pro-apoptotiques transitent de cet organite au cytoplasme et/ou au noyau pour pourvoir à leurs fonctions biologiques [Ouali et al., 2013 ; Sierra and Oliván, 2013]. Ces organites ont ainsi un rôle important dans l'apoptose *post-mortem*.

c) Les protéines impliquées dans le voies de transport, de signalisation et d'apoptose

D'autres voies biologiques telles que le transport, la signalisation et l'apoptose ont été décrites comme source de biomarqueurs de la tendreté **(Tableau 4)**. De nombreuses études ont montré des liens étroits entre les voies apoptotiques et l'attendrissage de la viande [Kemp and Parr, 2012 ; Ouali et al., 2013 ; Sierra and Oliván, 2013 ; Gagaoua et al., 2012, 2015b]. Parmi les protéines identifiées, les annexines font partie d'une grande famille de protéines structurellement apparentées et sensibles au Ca^{2+}. Exprimées dans toutes les cellules eucaryotes, elles participent à de nombreux processus cellulaires incluant l'apoptose et la signalisation intracellulaire [Monastyrskaya et al., 2009]. [Bjarnadóttir et al., 2012] ont observé une diminution des niveaux d'annexine A6 (ANXA6) dans des viandes tendres en suggérant que cela pouvait entraîner une libération accrue de Ca^{2+} et donc affecter l'activité des calpaïnes. Dans le muscle *post-mortem*, l' ANXA6 peut freiner l'apoptose en inhibant la protéine 1 liée à la dynamine (DRP1) mais aussi en intensifiant la libération de cytochrome C peu après la mort de l'animal [Ouali et al., 2013]. Enfin, des variations de concentration de la protéine annexine A1 (ou lipocortine-1), probablement associée à l'apoptose, ont été rapportées comme associées aux modifications *post-mortem* du muscle [Zhao et al., 2010]. La galectin-1, une lectine β-galactose impliquée dans le processus apoptotique, a également été proposée comme potentiel biomarqueur de la tendreté de la viande bovine [Zapata et al., 2009 ; Bjarnadóttir et al., 2012]. Ces deux études suggèrent qu'une expression inférieure de la galectine-1 est associée à une plus grande tendreté. Comme nous l'avons vu au cours du premier chapitre, de nombreux mécanismes *post-mortem* du muscle sont contrôlés par l'homéostasie du Ca^{2+} [Ouali et al., 2013] et de nombreuses protéines impliquées dans la régulation du Ca^{2+} sont décrites comme importantes pour la qualité de la viande [Picard et al., 2010]. Par exemple, l'abondance de la parvalbumine a été observée comme plus élevée dans des muscles tendres des bovins Charolais et Limousins [Bouley et al., 2004c]. La parvalbumine qui présente une forte affinité pour les ions Ca^{2+} participe au transfert de Ca^{2+} entre le cytoplasme et le RS, en particulier dans les fibres rapides [Berchtold et al., 2000]. L'inositol 1,4,5-triphosphate type 1 (IP3R1), une autre protéine impliquée dans l'activité calcique, a également été rapportée comme plus abondante dans des viandes plus tendres [Kim et al., 2008]. La protéine IP3R1, associée à la protéine Hsp70-Grp75 ont récemment étaient décrites comme jouant un rôle majeur dans la transformation du muscle en viande [Gagaoua et al., 2015a].

d) Les protéines associées au stress oxydatif et détoxification

Durant la transformation du muscle en viande, le muscle est soumis à diverses espèces oxygénées réactives qui peuvent affecter à la fois la fraction lipidique et la fraction protéique [Brand, 2010]. Les espèces activées de l'oxygène (EAO ou ROS en anglais) sont des radicaux libres, neutres ou chargés, qui sont très instables en raison de la présence d'un électron non-apparié sur leur couche externe [Gutteridge, 1994]. Les principaux ROS sont l'anion superoxide ($O2^-$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le radical hydroxyle (HO^-). L'instabilité de ces ROS les rend très réactifs vis à vis d'autres molécules environnantes. Les réactions de transfert d'électrons qu'ils produisent (réactions d'oxydo-réduction ou redox) conduisent souvent à la formation d'un nouveau ROS, ce phénomène pouvant se propager par des réactions en chaîne. L'état redox d'une cellule dépend de la balance entre sa production de ROS et sa capacité à contenir leur toxicité [Oberley et al., 2000]. Un déséquilibre de cette balance peut induire une accumulation excessive de ROS induisant un « stress oxydant » qui va entraîner des effets néfastes sur de nombreuses molécules telles que l'ADN, les protéines ou les lipides. L'arrêt de la chaîne respiratoire induit par l'apoptose intrinsèque va être à l'origine d'une perturbation de ce potentiel redox, et donc à l'origine d'une accumulation de ROS favorisant ainsi la formation de pores dans la mitochondrie [Rottenberg and Hoek, 2017]. Par conséquent, l'accumulation de ROS pourrait perturber les changements *post-mortem* du muscle, ce qui pourrait favoriser la protéolyse *post-mortem* et ainsi la tendreté de la viande [Herrera et al., 2017]. D'ailleurs, [Stennicke and Salvesen, 1999] ont montré que les ROS pouvaient inhiber les caspases par l'oxydation des résidus cystéine.

De nombreuses études en lien avec la tendreté de la viande bovine ont identifié des protéines « protectrices » du stress oxydant : les péroxyrédoxines (PRDX1, PRDX2, PRDX3 et PRDX6), les superoxyde dismutases (SOD), la protéine DJ-1, l'anhydrase carbonique (CA3) et l'aldéhyde déhydrogénase (ALDH) [Jia et al., 2009 ; Guillemin et al., 2012 ; Polati et al., 2012 ; Grabež et al., 2015 ; Picard et al., 2012 ; D'Alessandro and Zolla, 2013b] **(Tableau 4)**. Les protéines SOD sont des métalloprotéases antioxydantes qui permettent la décomposition rapide de l'O_2^- à l'O_2 puis à l'H_2O_2 [Zelko et al., 2002]. Dans une étude récente la superoxyde dismutase à cuivre et à zinc (CuZn-SOD ou SOD1) a été rapportée comme plus abondante dans les viandes dures [Grabež et al., 2015] et positivement corrélée avec la WBSF dans le muscle *Semitendinosus* [Guillemin et al., 2012]. Des études suggèrent qu'une augmentation du stress oxydant pourrait conduire à une accumulation de ROS dans les viandes dures et ainsi réduire la protection cellulaire via la protéine SOD1 [Grabež et al., 2015]. La

protéine DJ-1 (codée par le gène PARK7) est décrite comme un oncogène responsable de l'apparition précoce de la maladie de Parkinson [Bonifati et al., 2003 ; Canet-Avilés et al., 2004]. C'est également une protéine antioxydante, hautement conservée, qui a la capacité d'être oxydée et transloquée à la mitochondrie en réponse à un stress oxydatif [Mitsumoto et al., 2001]. Elle possède ainsi un rôle anti-apoptotique et protecteur contre la toxicité cellulaire en réponse au stress oxydant en limitant le fragmentation mitochondriale [Thomas et al., 2011]. La protéine DJ-1, a été rapportée comme associée à la tendreté de la viande [Jia et al., 2009 ; Picard et al., 2014]. [Polati et al., 2012] ont noté une augmentation de son abondance dans le muscle *Longissimus* durant les étapes précoces de mise en place de la tendreté. Cette augmentation a également été observée après 10 heures [Jia et al., 2007] mais aussi après 5 à 21 jours *post-mortem* [Laville et al., 2009].

Les péroxyrédoxines (PRDX) sont décrites comme une famille de protéines jouant un rôle important dans l'homéostasie cellulaire. Ce sont des peroxydases capables de dégrader à la fois le peroxyde d'hydrogène mais aussi les peroxydes organiques [Yamashita et al., 1999 ; Fisher, 2011]. Parmi les péroxyrédoxines rapportées comme associées à la tendreté de la viande [Jia et al., 2009] ont identifié la PRDX6. Cette protéine présente des caractéristiques uniques qui la différencient des autres membres de la famille [Ouali et al., 2013]. En effet, PRDX6 est la seule peroxyrédoxine à ne posséder qu'un seul résidu cystéine (au lieu de 2 pour les autres membres). Elle est aussi la seule à utiliser le glutathion plutôt que la thioredoxine comme donneur d'électron dans son cycle catalytique. C'est également la seule enzyme à posséder une activité réductrice des hydroperoxydes de phospholipides (activité phospholipase A2 (PLA2)) indépendant du Ca^{2+} en milieu acide [Fisher, 2011]. D'ailleurs, [Gagaoua et al., 2015d] ont rapporté PRDX6 comme associée à la chute de pH et à la couleur de la viande. Une autre protéine de la famille, le précurseur mitochondrial PRDX3 (ou thioredoxine dependante de la péroxyde réductase) a également été rapportée comme plus abondante dans les viandes tendres [Grabež et al., 2015]. La protéine PRDX3 a été décrite comme un système très efficace dans la régulation de la production de ROS dans la mitochondrie [Jia et al., 2007]. L'anhydrase carbonique (CA3), enzyme présente à la surface de la membrane plasmatique intracellulaire, est capable de convertir le CO2 en bicarbonate (et inversement). Des auteurs ont suggéré que sa présence dans le muscle *post-mortem* pourrait être associée aux modifications des profils de pH après la mort de l'animal [Boudjellal et al., 2008 ; Ruusuvuori and Kaila, 2014]. Rapportée comme surabondante dans le muscle bovin *post-mortem*, la protéine CA3 a aussi été décrite comme corrélée avec la WBSF [Polati et al., 2012 ; D'Alessandro et al., 2012b]. Enfin, l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) qui est impliquée dans la glycolyse [Jia et al., 2006b] est aussi décrite comme

impliquée dans la protection cellulaire contre le stress oxydant [Ohta et al., 2004]. Même si son rôle dans le muscle *post-mortem* n'est pas encore bien connu, l'ALDH été proposée comme biomarqueur négatif de la tendreté dans les muscles glycolytiques [Guillemin et al., 2012].

e) Les protéines de choc thermique (HSP)

Extrêmement conservées au sein de toutes les espèces, les protéines chaperonnes appelées protéines de choc thermique (HSP, « Heat Shock Protein ») jouent un rôle crucial dans le repliement des protéines, dans l'assemblage de complexes protéiques, dans le transport protéique, dans le contrôle et la signalisation du cycle cellulaire, mais aussi dans la protection des cellules contre stress et/ou l'apoptose [Lomiwes et al., 2014]. Les protéines HSP constituent une grande famille de protéines qui sont classées en fonction de leur poids moléculaire (PM) (ex : HSP40, hsp70, hsp90…). Ces protéines sont synthétisées en réponse à une condition de stress. La surexpression de protéines HSP aurait un rôle anti-apoptotique [Samali and Cotter, 1996]. En effet, les protéines HSP sont capables de former un complexe avec les caspases ou les cathepsines pour les inhiber [Beere, 2004, 2005 ; Arrigo et al., 2002]. En raison de leurs propriétés anti-apoptotiques, l'hypothèse de l'implication des protéines HSP dans le processus de transformation du muscle en viande a été proposée [Ouali et al., 2006]. Des études du protéome musculaire ont permis d'identifier plusieurs protéines HSP dont l'abondance augmente durant la période *post-mortem* [Pulford et al., 2008 ; Jia et al., 2009] **(Tableau 4)**. Cette augmentation serait due à une réponse au stress cellulaire induit par la mort de l'animal. [Picard et al., 2014] ont émis l'hypothèse selon laquelle une surexpression de HSP70 permettrait de maintenir l'intégrité de la cellule musculaire et la réparation des protéines dénaturées. D'ailleurs la protéine HSP70 a été rapportée comme associée avec la tendreté de la viande bovine [Jia et al., 2009 ; Carvalho et al., 2014]. Une diminution des niveaux de HSP70 a été observée dans le muscle *Longissimus* après 48h *post-mortem*. Protéine importante pour le développement musculaire, la protéine HSP70 a été proposée comme biomarqueur négatif de la tendreté [Guillemin et al., 2012]. La protéine HSP40 (codée par le gène DNAJA1), connue pour retarder le processus de mort cellulaire, a également été décrite comme négativement reliée à la tendreté [Bernard et al., 2007], alors que le transcrit de la protéine HSP27 (codée par le gène HSPB1) a été rapporté comme positivement relié à la tendreté dans le muscle *Longissimus* [Morzel et al., 2008]. Il a été montré que la mise en place du complexe DNAJA1/HSP70 était capable d'inhiber directement l'apoptose en empêchant l'activité de la protéine pro-apoptotique BAX. Pour activer l'apoptose, la protéine BAX est adressée à la membrane mitochondriale où elle subit des changements conformationnels déclenchant la libération du cytochrome

et conduisant à l'activation de la voie intrinsèque des caspases : ainsi un complexe capable d'inhiber l'activité de *Bax* est capable d'inhiber l'apoptose. Les protéines HSP sont capables d'intervenir à différents niveaux sur l'apoptose : (i) en formant un complexe avec les caspases actives (initiatrices ou effectrices), les empêchant ainsi d'assurer leur fonction ; (ii) en protégeant des protéines cibles (substrats) des caspases effectrices, empêchant ou retardant ainsi leur dégradation par ces enzymes ; et (iii) en réparant ou tentant de réparer des protéines endommagées suite à un stress ou à l'initiation du processus apoptotique. Le stress aura donc, au travers des protéines HSP, un ensemble d'actions de nature anti-apoptotique. Cependant si ce stress est trop intense, la mort cellulaire par la voie intrinsèque dépendante des mitochondries sera induite [Ouali et al., 2006]. Dans les cellules musculaires, les petites protéines HSP sont décrites comme ayant un rôle de prévention des dommages et de la dégradation des protéines en réponse à l'apoptose. Elles protégeraient ainsi les filaments d'actine et autres protéines du cytosquelette de la dégradation due au stress provoqué par la mort de l'animal [Balan et al., 2014]. Ainsi la modulation de ces protéines pourrait expliquer des changements dans la stabilité des protéines myofibrillaires au cours de la période *post-mortem* [Jia et al., 2007 ; Bjarnadóttir et al., 2010]. Par conséquent, ces mécanismes *post-mortem* impliquant les petites protéines HSP pourraient également être impliqués dans le déterminisme de la tendreté [Lomiwes et al., 2014]. Deux petites protéines HSP (HSP20 et αB-cristalline) ont été observées comme très fortement augmentées durant la phase période *post-mortem* précoce dans le muscle *Longissimus* de bovin [Pulford et al., 2008 ; Kim et al., 2008]. D'autre part, des études ont suggéré que les variations d'abondance de la protéine HSP20 pourraient conduire à une diminution de la stabilité des filaments d'actine, laquelle serait associée à une augmentation de la tendreté de la viande [Zapata et al., 2009]. La protéine HSP20 a d'ailleurs été proposée comme biomarqueur positif de la tendreté [Guillemin et al., 2012]. Enfin, il est intéressant de noter que [Picard et al., 2014] ont montré une relation inverse entre le tendreté et les petites protéines HSP (HSP20, HSP27 et αB-cristalline) selon le type de muscle ou selon la race étudiés. Ces trois protéines sont décrites comme négativement reliées à la tendreté dans le muscle *Semitendinosus* alors qu'elles sont positivement reliées à la tendreté dans le muscle *Longissimus*. Ainsi, il semble évident que l'implication des HSP dans la tendreté de la viande bovine passe par leur expression à la fois constitutive et inductive.

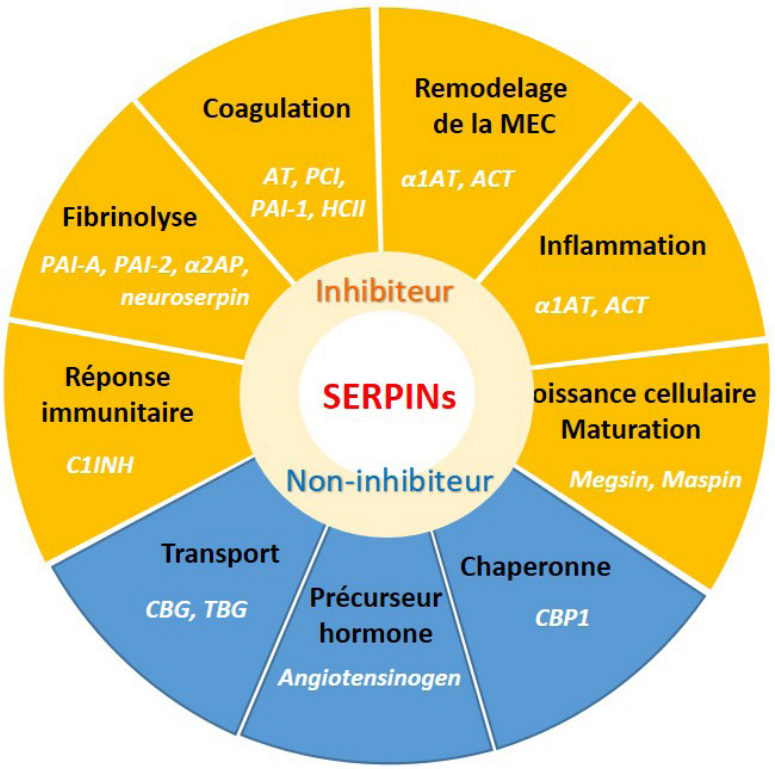


Figure 32. Les fonctions de régulation des SERPINs

f) Les inhibiteurs de protéase à sérine : les Serpins

L'efficacité des systèmes protéolytiques endogènes est principalement modulée par la présence ou l'absence de leurs inhibiteurs spécifiques [Shackelford et al., 1991; Ouali and Talmant, 1990]. D'ailleurs, plus récemment des études ont rapporté qu'après l'abattage des animaux, parmi une trentaine de variables incluant les calpaïnes, calpastatines, inhibiteur de protéases à cystéine…, les taux d'inhibiteurs de protéases à sérine) sont les meilleurs prédicteurs de la tendreté de la viande [Zamora et al., 1996, 2005]. La plupart de ces inhibiteurs à sérine appartiennent à la famille des SERPINs et certaines ont été décrites comme des inhibiteurs de caspases [Herrera-Mendez et al., 2009 ; Gagaoua et al., 2013], un système protéasique de protéases à cystéine considéré comme un système inducteur d'apoptose [Danial and Korsmeyer, 2004 ; Li et al., 2004]. Plusieurs protéases de sérine (ex : plasmine, thrombine…) ont été décrites comme synthétisées par des cellules musculaires [Sentandreu et al., 2002]. Plus tard, plusieurs SERPINs, parmi lesquelles l'antithrombine III (AT-III ou SERPINA3-1), la mEndopin 2A (ou SERPINA3-3), ainsi que deux autres membres de la famille SERPINA3 (mEndopine 1A (ou bovserpina3-1) et mEndopine 1A (ou bovserpina3-3) ont été extraites et caractérisées biochimiquement à partir du tissu musculaire **(Tableau 4)** [Tassy et al., 2005 ; Herrera-Mendez et al., 2006].

De récents travaux ont permis d'identifier au moins 9 membres de la famille des SERPINA3. Le gène codant cet inhibiteur est constitué de 4 exons et de 3 introns. Elles ont la capacité d'inhiber la chymotrypsine, la trypsine, la plasmine ainsi que les caspases-3 et caspases-8, considérées comme des protéases à cystéines impliquées dans l'apoptose [Pelissier et al., 2008 ; Herrera-Mendez et al., 2009 ; Gagaoua et al., 2013]. Les SERPINs sont impliquées dans d'autres voies biologiques **(Figure 32)**.

Comme illustré tout au long de ces deux premiers chapitres, l'analyse protéomique réalisée à partir d'échantillons musculaires a apporté de nombreuses connaissances qui ont permis de mieux comprendre le déterminisme de la tendreté. Cependant des limites subsistent, notamment en raison de la variabilité des biomarqueurs de tendreté en fonction du type de muscle, du type d'animal, de sa race ou encore des pratiques d'élevage ou de l'environnement. Ceci suggère que des biomarqueurs différents seraient à considérer selon la race et les pratiques d'élevage afin de mettre en place des tests prédictifs de la qualité de la viande. Toutefois, la nature de l'échantillon pourrait permettre de s'affranchir de l'effet muscle et pourrait permettre de prédire le « potentiel qualité » d'un animal. Le développement de marqueurs peu-invasifs, et plus particulièrement des biomarqueurs plasmatiques, apparait donc comme un outil prometteur pour prédire ce potentiel du vivant de l'animal (en ferme) ou du moins plus précocement (à l'abattoir). En profitant des progrès de la protéomique, nous souhaitons identifier une liste de biomarqueurs peu-invasifs capables de prédire le « potentiel tendreté » d'un animal.

Caractéristiques	Tissus	Bio-fluides
Concentration en biomarqueurs	Importante	Faible
Permet d'étudier un environnement cellulaire particulier	Oui	Non
Permet d'étudier une fonction cellulaire	Oui	Non
Permet de comparer des concentrations (ou niveaux) tissulaires	Oui	Non
Facile à obtenir (prélèvement)	Non	Oui
Utilisable pour un « diagnostic » précoce	Non	Oui
Utilisation pour suivi thérapeutique (ou management de la qualité)	Oui	Oui

Tableau 5. Liste non-exhaustive des avantages et inconvénients de l'utilisation de tissus ou de bio-fluides dans un contexte de recherche de biomarqueurs
D'après [Xu et al., 2008]

III. La protéomique des tissus et des bio-fluides : des sources de biomarqueurs ?

L'approche protéomique a suscité l'intérêt des chercheurs en clinique humaine mais aussi en médecine vétérinaire, notamment en ce qui concerne la production de produits biopharmaceutiques, ou le diagnostic de maladies chez les animaux de ferme. Elle est aujourd'hui également utilisée pour répondre aux attentes des filières, notamment impliquées dans une « course à la qualité » des produits, et plus particulièrement la viande et le lait [Van Altena et al., 2016 ; Picard et al., 2018; Moisá et al., 2019]. La question fondamentale à prendre en considération avant de se lancer dans un projet recherche de biomarqueurs réside dans le choix du type d'échantillons à étudier [Yan and Chen, 2005]. Il s'agit de trouver le meilleur équilibre entre les avantages et les inconvénients d'utiliser un type d'échantillon plutôt qu'un autre afin de répondre, de la façon la plus pertinente, à l'objectif final de l'étude. Une liste non-exhaustive de ces avantages et inconvénients, en lien avec l'utilisation d'échantillons tissulaires et/ou de bio-fluides, est présentée dans le **Tableau 5**. En raison de leur accessibilité plus aisée par rapport aux biopsies tissulaires, les fluides biologiques sont aujourd'hui des cibles de choix pour la recherche de biomarqueurs diagnostiques, pronostiques et même pour le suivi d'un traitement. Un dogme de la biologie consiste à dire que les tissus, qui sont en contact avec les fluides biologiques (ou « bio-fluides »), sont susceptibles de libérer des composants protéiques dans les fluides. Ainsi, le profil des abondances protéiques libérés serait le reflet de l'état physio-pathologique des individus. Même s'il réside un large fossé entre cette théorie et la pratique, cette affirmation reste clairement illustrée par les quantités de données protéomiques axées sur des études de bio-fluides qui ont permis l'identification de nouveaux biomarqueurs. Les identifications de biomarqueurs, au sens propre, au travers de la protéomique sont cependant peu nombreuses. En effet, même si le nombre de candidats identifiés reste important, la plupart des études ne vont pas plus loin que la phase de découverte. C'est pourtant la phase de validation, que nous avons décrit précédemment, qui permettrait d'identifier et de valider l'intérêt biologique de ces « biomarqueurs » potentiels.

1. Les différents fluides biologiques

Les fluides collectés à partir d'un organe (ou structure anatomique) spécifique (ex : liquide-céphalo-rachidien (LCR), liquide articulaire ou fluide pleural), sont favorables à l'identification de biomarqueurs associés à l'état physio-pathologique de l'organe de par leur proximité avec l'organe et le faible effet de dilution qui en résulte. Ces fluides, en dépit de leur haute complexité similaire à celle du plasma, sont cependant difficiles à collecter car ils nécessitent des méthodes invasives, relativement

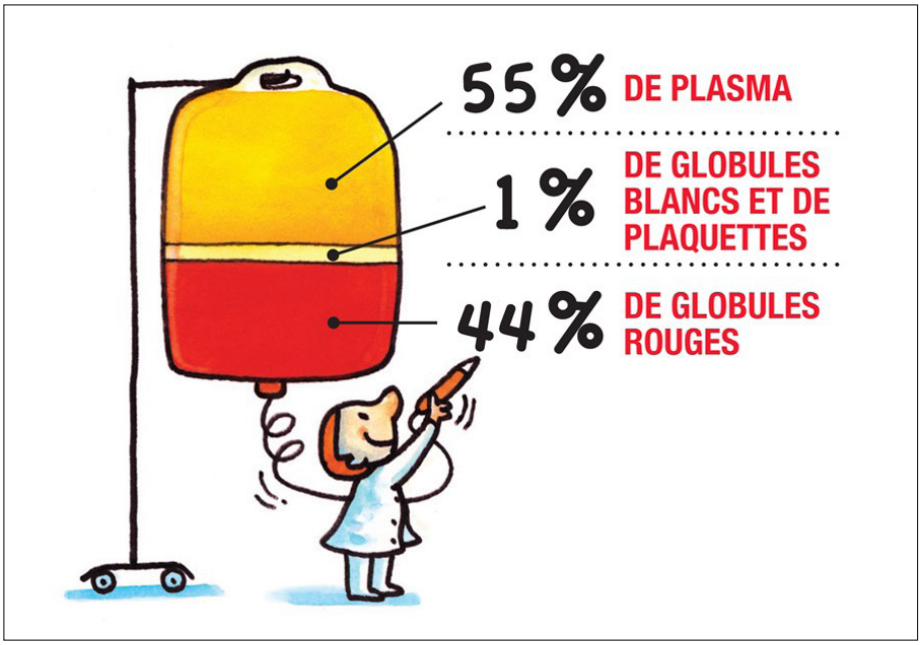


Figure 33. Le sang et le plasma

Le sang est constitué du plasma (55% du volume du sang total) et des cellules sanguines en suspension dans le plasma (globules blancs, plaquettes et les globules rouges). Le plasma est formé d'eau à 90%, de sels, de lipides et d'hormones. Il est surtout riche en liquide riche en protéines, dont l'albumine, sa protéine principale, les immunoglobulines, ainsi que les facteurs de coagulation et le fibrinogène. Le plasma présente des fonctions diverses telles que le transport des cellules sanguines et des substances nutritives, la régulation des niveaux d'eau et des sels minéraux de l'organisme, l'irrigation des tissus, la défense contre les infections, la coagulation du sang.

Source: https://www.hema-quebec.qc.ca

comparables aux méthodes de biopsies tissulaires. Cependant, dans le cas du LCR au moins, l'organe ciblé (le cerveau) est par ailleurs difficile à analyser par biopsies, en particulier sur des sujets témoins sains. En plus, en raison de leur disponibilité plutôt limitée, ces fluides ne permettraient par une détection précoce de biomarqueurs dans une large population dont les individus présentent des symptômes peu marqués. Dans ce contexte, ces fluides présentent un intérêt mais pour un spectre limité de maladies.

Les fluides corporels « excrétés » (ex : urine, salive ou bile) et en particulier l'urine sont plutôt faciles à collecter et disponibles en grande quantité, ce qui pourrait être intéressant pour des applications en protéomique. Cependant, ces fluides ne présentent pas une composition homogène, ce qui fait que des concentrations protéiques dans l'urine peuvent passer du mg/L au g/L en fonction de l'état de la maladie. De plus, ces fluides contiennent diverses concentrations, généralement élevées, de composés excrétés, tels que des sels, de l'urée ou des agents solubilisants. Ces facteurs rendent donc ces fluides très difficiles à analyser en protéomique comparative. C'est le cas de l'urine au sein de laquelle les protéines excrétées proviennent de plusieurs organes impliqués dans sa production (ex : reins, voies urinaires, vessie), mais aussi pour le protéome plasmatique où les protéines sont notamment issues de la filtration glomérulaires et de la sécrétion tubulaire.

Les fluides corporels tels que le plasma (ou le sérum) sont décrits comme étant les plus adaptés à la recherche de biomarqueurs. En effet, facile à collecter, le plasma (ou sérum) qui recueille des protéines issues de l'ensemble des tissus de l'organisme, serait une source « universelle » de biomarqueurs [Geyer et al., 2017], contrairement à d'autres fluides comme l'urine ou le LCR. Ainsi, la plupart des biomarqueurs protéiques utilisés à ce jour en biologie clinique sont quantifiés dans le plasma. Dans la suite de ce manuscrit nous nous focaliserons principalement sur l'utilisation de ce fluide en protéomique.

2. L'étude du protéome plasmatique

a) Le plasma : un fluide complexe

Le plasma sanguin est le composant liquide du sang, dans lequel les cellules sanguines sont en suspension **(Figure 33)**. Le sérum, dont la composition est proche du plasma, ne contient pas de protéines de coagulation ni de fibrinogène, cependant sa préparation nécessite une étape supplémentaire par rapport à celle du plasma pour éliminer ces constituants. Le plasma comporte un large répertoire de biomolécules, dont des protéines, qui circulent en permanence dans le système vasculaire. Le sang en circulation, qui peut être prélevé facilement et de manière peu-invasive, reste l'échantillon de choix pour

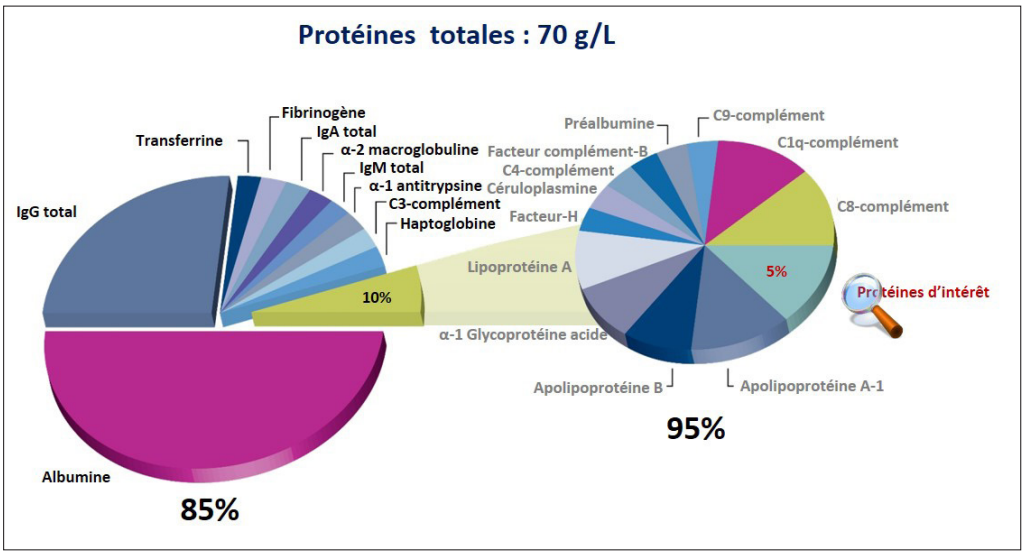


Figure 34. Composition du protéome plasmatique
Les 10 protéines les plus abondantes représentent approximativement 85% de la masse protéique du plasma (ou sérum) Humain (gauche). Les 22 protéines les plus abondantes représentent environ 95% de la masse protéique totale dans le plasma humain (droite + gauche). Les protéines d'intérêt, source de potentiels biomarqueurs représentent donc approximativement 5% de la masse protéique (rouge). Immunoglobulines (IgX).
Source adaptée de [https://pharmaceuticalintelligence.com] (consulté le 10/11/2019)

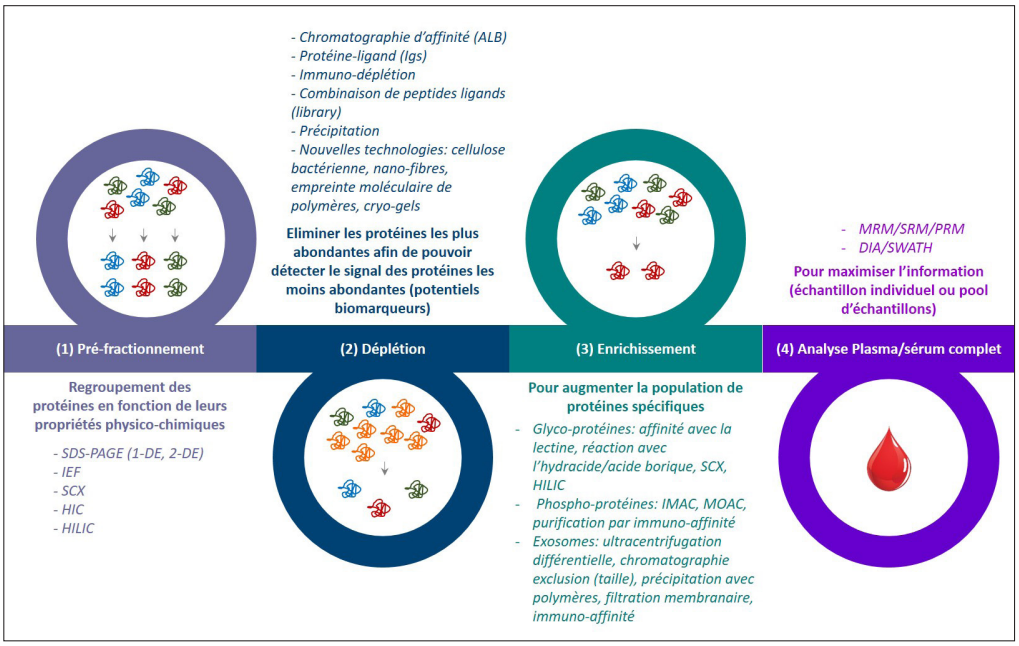


Figure 35. Stratégies pour l'analyse du plasma (ou sérum) en protéomique
Au vu de la complexité et de la gamme dynamique des échantillons de plasma et de sérum, de nombreuses stratégies ont été développées afin d'améliorer la détection des protéines à faible abondance dans ces échantillons. Elles comprennent (1) Le pré-fractionnement des échantillons afin de regrouper les protéines en fonction de leurs propriétés physico-chimiques, (2) La déplétion des protéines majoritaires afin de réduire la complexité de l'échantillon et comprimer la gamme dynamique, si besoin (3) L'enrichissement de protéines d'intérêt (ex : protéines phosphorylées ou glycosylées) et (4) une analyse du plasma/sérum complet (échantillons individuels ou poolés) afin de maximiser l'information biologique relative aux protéines.
D'après [Lee et al., 2019]

la réalisation de tests diagnostiques en clinique Humaine ou vétérinaire. Aussi, le plasma est aussi largement étudié en protéomique, notamment dans des programmes de recherche de biomarqueurs associés à des maladies humaines [Osman et al., 2019]. Cependant ces programmes donnent des résultats peu satisfaisants [Geyer et al., 2016]. Ceci peut s'expliquer principalement par le fait que la plupart des biomarqueurs sont retrouvés dans des concentrations extrêmement faibles dans le plasma, ce qui les rend indétectables pour la plupart des spectromètres de masse les plus évolués [Liumbruno et al., 2010]. Ceci est encore plus accentué par la complexité et par la gamme dynamique du protéome plasmatique qui fait qu'il peut y avoir des variations de l'ordre de 10 ordres de grandeurs entre les concentrations des protéines les moins abondantes et celles des protéines les plus abondantes [Anderson and Anderson, 2002 ; Hortin and Sviridov, 2010]. En effet, l'albumine qui est la protéine la plus abondante du plasma, représente à elle seule 55% de la teneur totale en protéines. Avec les 10 protéines majoritaires (Immunoglobulines IgG et IgA, haptoglobine, transferrine…) et les 12 protéines du compléments, l'ensemble de ces 22 protéines représente environ 85% du protéome plasmatique total [Zolotarjova et al., 2005 ; Lee et al., 2019], ainsi la plupart des biomarqueurs candidats seront donc identifiables dans les 5% restants **(Figure 34)**.

b) Le protéome plasmatique : une méthodologie particulière

Afin de pouvoir traiter ces échantillons complexes, des stratégies expérimentales particulières, adaptées à la recherche protéomique de biomarqueurs dans le plasma ont été développées. Basé sur la stratégie du « diviser pour mieux régner », un fractionnement des échantillons peut être réalisé par diverses méthodes pour réduire la complexité et la gamme dynamique des échantillons. Les méthodes de fractionnement les plus couramment utilisées sont (i) la séparation par électrophorèse (1-DE ou 2-DE) ; (ii) la focalisation isoélectrique (IEF, pour l'anglais «isoelectric focusing ») et (iii) les techniques chromatographiques. Parmi ces dernières, on retrouve la chromatographie échangeuse de cations (SCX, pour l'anglais «strong cation exchange *chromatography*»), la chromatographie d'interaction hydrophobe (HIC, pour l'anglais « hydrophobic interaction chromatography »), ou la chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC, pour l'anglais « hydrophilic interaction liquid chromatography ») pour n'en citer que quelques-unes [Lim et al., 2016 ; El Rassi and Puangpila, 2017] **(Figure 35)**. Néanmoins, l'application de ces techniques de fractionnement seulement n'est pas suffisante pour permettre la détection de protéines à faible abondance dans des échantillons de plasma (ou sérum). Par conséquent, un certain nombre d'autres techniques ont été développées pour appauvrir les protéines d'abondance élevée ou pour enrichir

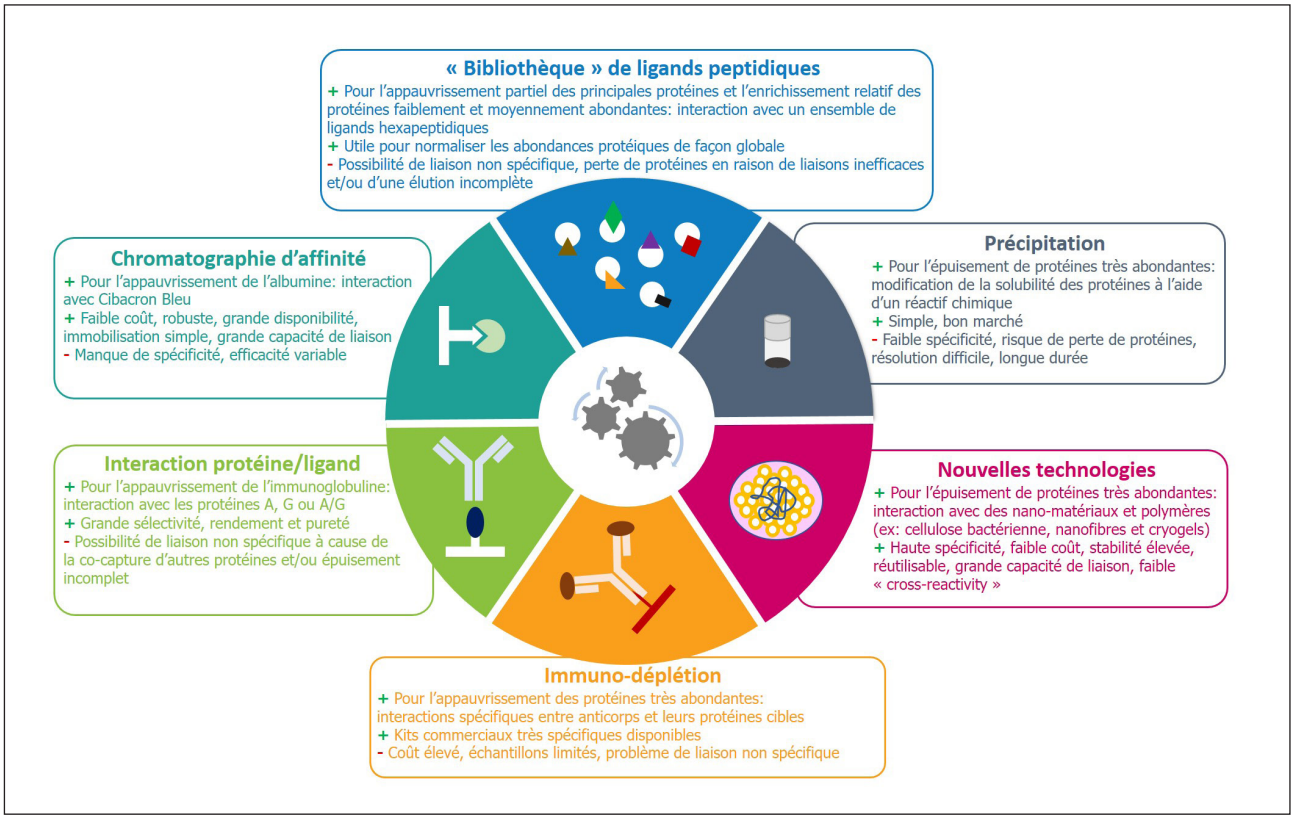


Figure 36. Différentes méthodes d'appauvrissement utilisées pour éliminer les protéines majoritaires du plasma (ou sérum)

Ces méthodes d'appauvrissement sont largement utilisées en protéomique pour l'étude du plasma et du sérum. Les protéines majoritaires de ces bio-fluides peuvent être éliminées par différentes stratégies basées sur l'utilisation du Cibacron bleu, un colorant réactif (turquoise), des protéines A et G, (vert), des anticorps (orange), l'utilisation d'une « bibliothèque » de ligands hexapeptidiques (bleu), la précipitation chimique (gris) ou des technologies basées sur l'utilisation de polymère (fushia).

D'après [Lee et al., 2019]

les protéines d'intérêt. Parmi ces techniques, utilisées pour épuiser les protéines très abondantes dans le plasma, on retrouve **(Figure 36)** :

• **La chromatographie d'affinité.** En raison de son abondance élevée, l'albumine sérique représente la première cible à éliminer du plasma. La chromatographie d'affinité a été l'une des premières techniques utilisée pour éliminer l'albumine du plasma (ou sérum) , notamment suite à la découverte du cibacron bleu (CB), un colorant réactif qui présente une affinité élevée envers les protéines [Dean and Watson, 1979 ; Denizli and Pişkin, 2001]. Depuis, en raison de son faible coût, sa robustesse, sa grande disponibilité, facilité d'immobilisation et sa capacité de liaison élevée aux protéines, le CB a été largement utilisé pour isoler l'albumine sérique, mais aussi d'autres protéines [Leatherbarrow and Dean, 1980 ; Li et al., 2017b]. Plusieurs matrices ont été utilisées comme « matériel d'immobilisation » du CB, mais selon le type de matrice utilisée l'appauvrissement en albumine est variable. En effet, l'utilisation de la colonne « Affi-gel Blue » (Hitrapblue ; GE Healthcare, Uppsala, Suède) permet d'appauvrir un échantillon de plasma Humain à 98% [Travis et al., 1976]. D'autres matrices comme la « poly-[méthacrylate de glycidyle] », le cryogel « poly-[GMA]- poly-[méthacrylate d'hydroxyéthyle] » ou les « nano-billes de poly-[méthacrylate de glycidyle] » ont été rapportées pour atteindre des appauvrissements de 99,3% [Altintaş and Denizli, 2006], 77% [Andac et al., 2012] où 95% [Andaç, 2015] respectivement. Néanmoins, en raison d'un manque de spécificité [Andac et al., 2007], ces méthodes appauvrissent également les échantillons en d'autres protéines de faible abondance. Ainsi, ces techniques ont été remplacées par des techniques de déplétion plus sophistiquées.

• **Déplétion par interaction protéine-ligand.** Un autre groupe de protéines est également retrouvé en forte abondance dans les échantillons de plasma (et sérum) : les immunoglobulines (IG). Les protéines A et G sont couramment utilisées pour appauvrir les échantillons en IG, mais elles présentent des degrés de spécificité et d'affinité de liaison différents à l'égard des IG provenant de différentes espèces [Saha et al., 2003]. Pour améliorer l'efficacité de liaison et la purification des échantillons, des formes recombinées (protéine A/G) obtenues à partir de formes tronquées des protéines A et G ont été produites [Ma and Ramakrishna, 2008]. Actuellement, des colonnes d'affinité commerciale contenant des protéines A, G ou A/G sont couramment utilisées pour purifier des échantillons de plasma (ou sérum) en IG [Bergmann-Leitner et al., 2008 ; Salimi et al., 2018]. Néanmoins, comme pour l'albumine, cette méthode n'est pas toujours très spécifique en raison de la co-capture d'autres protéines sur la colonne et/ou de l'épuisement incomplet des protéines cibles [Ma and Ramakrishna, 2008]. Ainsi, l'utilisation de

ces méthodes ne permet pas un appauvrissement suffisant en albumine et IG pour une utilisation des échantillons de plasma (ou sérum) en protéomique [Polaskova et al., 2010].

- **Immuno-déplétion.** L'appauvrissement immunologique des protéines majoritaires est couramment utilisé pour l'études des bio-fluides complexes [Garcia et al., 2017]. Cette méthode, basée sur des interactions spécifiques entre des anticorps et leurs cibles protéiques, permet la capture sélective des protéines les plus abondantes et leur élimination **(Figures 35, 36)**. Des kits commerciaux répondant à ce principe ont été développés. Ils se présentent sous forme de colonnes contenant des mélanges d'anticorps spécifiques fixés sur une résine. Ainsi, au contact de l'échantillon, cette dernière retient les protéines cibles d'abondance élevée en laissant libres les protéines minoritaires qui seront éluées et utilisées à des fins d'analyse protéomique. En terme de performance, des travaux ont montré que ces kits d'immuno-déplétion présentent une spécificité > 90% avec une reproductibilité (écart-type <20%) [Garcia et al., 2017; Wewer Albrechtsen et al., 2018 ; Lan et al., 2018 ; Kitamura et al., 2017]. Des études montrant les profils protéiques obtenus en analyse LC-MS/MS ont indiqué que l'utilisation de colonne ciblant des nombres croissants de protéines majoritaires permet d'améliorer le nombre de protéines identifiées [Roche et al., 2009 ; Smith et al., 2011]. En effet, des colonnes ciblant 12, 14 ou 20 protéines majoritaires du plasma (ou sérum) permettent l'identification de 234, 272 ou 301 protéines respectivement par rapport à seulement 159 protéines pour des échantillons de plasma (ou sérum) non déplétés [Smith et al., 2011]. Néanmoins, on constate un bénéfice limité entre l'élimination de 20 protéines et celle des 12 et 14, ainsi, pour des raisons économiques les colonnes 12 et 14 sont plus largement utilisées par les scientifiques. Cette stratégie, appliquée à de nombreuses études protéomiques plasmatiques et/ou sériques, a permis l'identification d'un grand nombre de biomarqueurs potentiels associés à des maladies Humaines [Puttamallesh et al., 2013 ; Satoh et al., 2013 ; Yang et al., 2014 ; Bansal et al., 2016]. Cependant, outre leur coût élevé, ces kits commerciaux présentent certaines limites, notamment car il faut utiliser un volume limité d'échantillon, et parce que le nombre de sites de liaison pour chaque anticorps ne permet pas toujours un appauvrissement optimal pour des échantillons riches en protéines. De plus, certains anticorps immobilisés sur la colonne ne reconnaissent pas certaines isoformes protéiques, et d'autres anticorps sont soumis à des réactions croisées, ce qui peut entraîner une élimination inefficace des protéines majoritaires ou l'élimination de protéines non ciblées respectivement. D'ailleurs, l'efficacité de l'épuisement de certaines protéines majoritaires peut varier considérablement dans une colonne donnée, allant de 10 à plus de 90% [Beer et al., 2017], et l'appauvrissement de l'albumine sérique pourrait entraîner l'élimination de 35 autres protéines, dont 24 sont des protéines

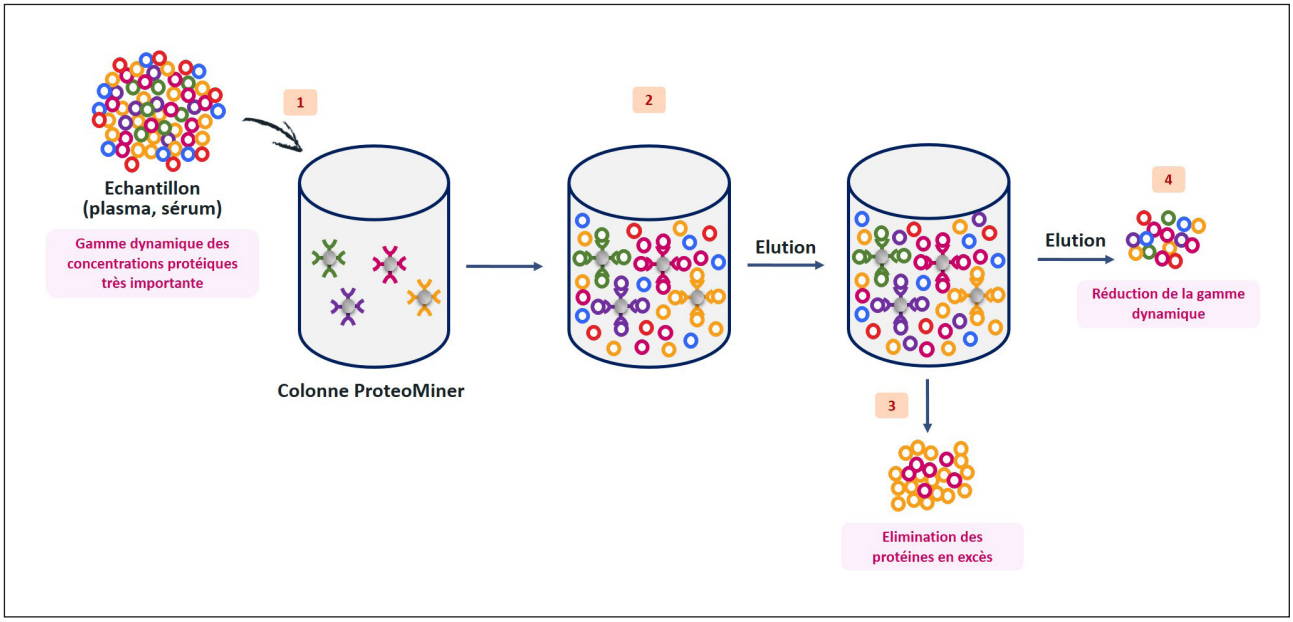


Figure 37. Principe de la technologie ProteoMiner® (BioRad)
Les colonnes ProteoMiner sont constituées d'une matrice (ou perle) constituée de ligands hexapeptidiques qui présentent des affinités pour des protéines spécifiques. Lorsque les échantillons (ex: plasma ou sérum) sont introduits dans la colonne (1), les protéines majoritaires se lient à leurs ligands spécifiques (2). Une étape d'élution permet d'éliminer les protéines en excès (3), alors que les protéines liées aux billes sont éluées dans un second temps (4). Ces dernières pourront ensuite être analysées en protéomique.
Source adaptée de [https://www.bio-rad.com/]

associées à l'albumine (ou « co-déplétion ») [Gundry et al., 2007]. Par conséquent, les protocoles d'immuno-déplétion peuvent modifier considérablement les profils de protéome et introduire des biais dans la découverte de biomarqueurs.

• **Utilisation d'une « bibliothèque » de ligand héxapeptidiques.** Une autre stratégie, basée sur l'utilisation d'une colonne de « capture » complexe, consiste à faciliter l'élution des protéines faiblement abondantes en réduisant la gamme dynamique des concentrations protéiques **(Figures 35, 36)**. Un kit très populaire, commercialisé par la société BioRad (Proteominer®, Californie, États-Unis), est constitué d'une gamme diversifiée de ligands hexapetidique (ou CPLL pour l'anglais « combinatorial peptide ligand library ») qui sont immobilisés sur une colonne à billes conçues pour capturer toutes les espèces de protéines possibles dans un échantillon biologique **(Figure 37)**. Le principe de cette technique est basé sur l'interaction spécifique et saturable entre chaque protéine et leur concentration dans l'échantillon [Guerrier et al., 2008]. Ainsi, comme il n'y a que des partenaires de liaison limités pour chaque protéine de la bibliothèque, les protéines à abondance élevée satureront rapidement leurs ligands et l'excès protéique sera ensuite éliminé. Inversement, les protéines de moindre abondance qui ne surchargeront pas leurs ligands respectifs, se lieront donc d'une manière dépendante à leur concentration [Righetti and Boschetti, 2015]. L'appauvrissement partiel et concomitant des protéines majoritaires et l'enrichissement relatif des protéines minoritaires et de moyenne abondance entraînent ainsi la compression de la gamme dynamique des concentrations protéiques de façon globale [Li, 2015]. La liaison sélective des protéines aux ligands de capture se fait par des interactions ioniques, des associations hydrophobes, la liaison à l'hydrogène et les forces de Van der Waals [Righetti et al., 2015]. Pour améliorer la détectabilité des protéines à faible abondance, les affinités des protéines peuvent être modulées en modifiant le pH ou la composition du tampon d'élution et en éluant successivement les protéines liées en fractions multiples [Boschetti and Righetti, 2013 ; Santucci et al., 2013]. Il a été démontré que les variations entre les différentes répliques sont minimes, indiquant la reproductibilité de la stratégie Proteominer®/méthode CPLL [Di Girolamo et al., 2013]. Plusieurs études ont rapporté que l'utilisation de ce kit, pour réduire la gamme dynamique, est une stratégie efficace pour l'analyse du protéome plasmatique/sérique lorsque l'on souhaite rechercher des protéines à faible abondance. Une étude comparant 7 kits d'enrichissement/d'épuisement a montré que le kit Proteominer® présente la meilleure performance pour réduire la gamme dynamique des concentrations protéiques par rapport à d'autres stratégies basées sur l'immuno-affinités ou l'appauvrissement par interaction protéine-ligand. Ce kit permet d'augmenter considérablement (68,6 %) le nombre de protéines identifiées dans des échantillons de plasma (ou sérum)

par rapport à des échantillons non traités [Pisanu et al., 2018]. Une étude de [Rice et al., 2015], réalisée chez l'Homme, a montré que cette stratégie permet d'améliorer considérablement les identifications en protéomique et potentiellement l'identification de nouveaux biomarqueurs. Néanmoins, la méthode CPLL présente des limites. En effet, les protéines qui manquent de ligand peptidique (ou partenaire) et/ou ont des affinités faibles avec ces derniers, ne sont pas efficacement retenues par la colonne, conduisant à une élimination de ces protéines [Thulasiraman et al., 2005]. De plus, les liaisons non-spécifiques et l'élution incomplète des protéines capturées sont toutes deux des limites rapportées pour la stratégie CPLL [Candiano et al., 2012]. Aussi, considérant que les protéines majoritaires sont à leur limite de saturation, la quantification après passage sur la colonne CPLL ne peut être effectuée que sur les protéines à faible abondance qui conservent leur proportionnalité. Enfin, il a également été révélé que cette technique est incapable de normaliser l'abondance des protéines de façon globale. Elle parvient seulement à fournir un enrichissement ou épuisement de populations protéiques spécifiques en fonction des rapports protéines/billes [Di Girolamo et al., 2013].

• **Méthodes de précipitation.** Les méthodes de précipitation chimique sont des stratégies classiques qui ont été élaborées pour isoler ou épuiser les protéines majoritaires **(Figures 35, 36)**. Une variété de produits chimiques comme la solution inorganique de sel [Mahn and Ismail, 2011], les solvants organiques [Liu et al., 2014], les polymères non-ioniques [Liu et al., 2016] ou les agents réducteurs [Warder et al., 2009] ont été utilisés dans ces méthodes. Par exemple, une solution d'ammonium sulfate peut être utilisée pour précipiter les protéines par réduction de leur solubilité, et ainsi éliminer la majorité de l'albumine sérique et autres protéines à haute abondance au travers de l'altération de leur force ionique [Bollineni et al., 2015]. Des stratégies alternatives utilisent des solvants organiques tels que l'éthanol [Colantonio et al., 2005], l'acide trichloroacétique/acétone [Chen et al., 2005] ou l'acétonitrile [Fernández et al., 2011]. Respectivement l'éthanol permet d'appauvrir les échantillons en IG et une partie de l'albumine (surnageant enrichi avec des protéines de faible PM) [Mehrani et al., 2011], l'acide trichloroacétique/acétone de les appauvrir en albumine et protéines majoritaires [Chen et al., 2005] et l'acétonitrile de les appauvrir en protéines de plus de 75 kDa, en particulier les apolipoprotéines [Fernández et al., 2011]. L'utilisation de polymères non-ioniques, tel que le polyéthylène glyocol (ou PEG pour l'anglais « polymer polyethylene glycol »), permet de précipiter de façon différentielle et non dénaturante les complexes fibronectine-fibrinogènes, l'IgG et l'albumine en utilisant des solutions de PEG à 4, 12 et 30% respectivement [Liu et al., 2016]. Cette stratégie, plus rapide que celle avec le sulfate d'ammonium, entraîne une séparation efficace des protéines les plus abondantes. Cette stratégie, qui

pourra être encore améliorée en combinant précipitation au PEG et immuno-déplétion permettra d'augmenter la couverture du protéome plasmatique [Liu et al., 2016]. La précipitation par des agents réducteurs permet également d'éliminer les protéines riches en pont disulfure. En effet, [Warder et al., 2009] ont montré que la précipitation de l'albumine pouvait être obtenue en présence de dithiothréitol (DTT) ou de tris(2-carboxyethyl)phosphine) (TCEP), et avec des résultats comparables à ceux obtenus avec l'utilisation du CB ou de l'immuno-déplétion. Enfin, [Henning et al., 2015] ont montré que la précipitation des protéines de sérums humains et animaux à pH légèrement acide (pH=4,2) et avec de faible concentration ionique permet d'éliminer les sels dans les échantillons. Ceci a permis d'obtenir des rendements protéiques satisfaisants, des profils protéiques reproductibles avec une gamme de PM équilibrée. Ces auteurs ont également montré que cette stratégie était capable d'éliminer des protéines majoritaires telles que l'albumine, l'apolipoproteine A1 (Apo A1), la sérotransférine (STF), la glycoprotéine α-2-HS (AHSG) et l'hémopexine (HPX). En comparant cette stratégie avec la stratégie CPLL, ces mêmes auteurs ont conclu que les deux méthodes étaient efficaces pour éliminer les protéines majoritaires telles que l'albumine et la transférine, cependant les profils protéiques obtenus sont nettement différents et partiellement complémentaires. Ainsi, l'ensemble de ces méthodes de précipitation sont économiques et faciles à réaliser pour éliminer les protéines majoritaires du plasma et du sérum, cependant les mécanismes moléculaires mis en jeu par ces stratégies ne sont pas clairement connues et leur faible spécificité et le risque d'éliminer des protéines minoritaires restent élevés. De plus, certaines protéines précipitées auraient du mal à être resolubilisées.

• **Nouvelles technologies basées sur l'utilisation de polymères.** Récemment, plusieurs études ont montré le potentiel des nanomatériaux biologiques pour l'appauvrissement des échantillons plasmatiques **(Figures 35, 36)**. La cellulose bactérienne est riche en groupes fonctionnels actifs qui peuvent être modifiés afin de synthétiser de nombreux types de nanostructures telles que les nanofibres. Les nanofibres de cellulose bactériennes, liées de façon covalente avec le CB, sont capables d'éliminer à plus de 96,5 % l'albumine du sérum humain [Tamahkar et al., 2010]. L'utilisation des nanomatériaux est intéressante car les surfaces de liaison aux protéines à cibler peuvent être importantes, très stables et réutilisables. Ainsi, en plus d'être économique, cette stratégie minimise les fixations aspécifiques des protéines non-ciblées. Il existe aussi des polymères à empreinte moléculaire. Ce sont des matériaux synthétiques générés par l'auto-assemblage de monomères fonctionnels. À l'aide de cette stratégie, il est possible de reconnaître et de capturer de manière sélective une large gamme de molécules cibles, y compris les protéines et les peptides. [Göktürk et al., 2018] ont montré que l'utilisation de monomères

fonctionnels tels que le N-méthacryloyl-L-histidine méthyl ester (MAH) associés à des ions métalliques comme le cuivre (ou MAH-Cu^{2+}) augmente la sélectivité de l'efficacité de l'appauvrissement des échantillons en albumine sérique, comparativement à la stratégie utilisant des nanofibres bactériennes. Yang et al. [Yang et al., 2013] ont rapporté que l'utilisation de récepteurs synthétiques à base de polymères à empreinte moléculaire étaient capables d'imiter la reconnaissance anticorps/albumine et/ou anticorps/IgG. Ces « anticorps synthétiques » permettent d'éliminer l'albumine et les IgG au sein d'échantillons de sérum humain avec une spécificité et une affinité élevées. Ces dernières sont comparables à un épuisement utilisant des anticorps commerciaux, mais supérieures aux stratégies utilisant le CB. Finalement, l'appauvrissement des échantillons plasmatiques et sériques, à base de polymères, est une stratégie plus performante que l'immuno-déplétion. En effet, les polymères, qui possèdent une capacité de liaison plus importante, présentent aussi une stabilité, une robustesse et une facilité de réalisation. En plus d'être économiques et de limiter les réactions croisées, ils sont une stratégie attrayante pour appauvrir les échantillons plasmatiques et sériques en protéines très abondantes. Plus récemment, des polymères, synthétisés par la polymérisation de monomères congelés (ou « cryogels »), ont été proposés pour séparer et purifier des échantillons en ciblant des biomolécules diverses [Saylan and Denizli, 2019]. [Yang et al., 2017] ont adapté cette approche en proposant de rajouter directement dans les échantillons sériques, une solution de monomères ciblant les protéines majoritaires, avant d'être congelés. Cette statégie, qui présente une capacité de liaison importante, est capable de dépléter des échantillons de plasma (ou sérum) pour de nombreuses protéines majoritaires telles que l'albumine, la sérotransférine et l'IgG.

Le développement des plateformes protéomiques a fourni de grandes perspectives pour l'identification de biomarqueurs précoces associés à des maladies à partir de bio-fluides. Les échantillons de plasma (et sérum) restent des ressources précieuses pour la communauté scientifique. Cependant, la complexité et la grande gamme dynamique des concentrations protéiques de ces échantillons posent des problèmes pour l'analyse protéomique de ces échantillons. De nombreuses stratégies, basées sur l'épuisement des protéines fortement abondantes pour enrichir les protéines d'intérêt faiblement abondantes dans ces échantillons (« principe du diviser pour mieux régner »), ont été développées afin d'améliorer la détection et l'identification de nouveaux candidats biomarqueurs. Ces stratégies ont permis d'identifier un certain nombre de biomarqueurs. Cependant, comme nous le verrons dans la suite de ce manuscrit, ces stratégies présentent des avantages et des limites. En dépit des progrès techniques récents,

il reste encore d'énormes défis analytiques à surmonter pour identifier de façon pertinente et le plus efficacement possible des biomarqueurs dans le plasma/sérum.

3. Le plasma comme source de biomarqueurs peu-invasifs

En biologie Humaine et vétérinaire, les biomarqueurs peuvent être divisés en biomarqueurs diagnostiques, pronostiques et prédictifs de traitement en fonction des informations qu'ils fournissent [Srinivas et al., 2002]. Un biomarqueur diagnostique est utilisé pour la détection précoce ou la présence de la maladie. Un biomarqueur pronostique est généralement utilisé pour prédire la récurrence et l'agressivité de la maladie, mais également pour prédire la réponse du patient à un traitement donné. Les biomarqueurs prédictifs sont des outils utiles pour classer les patients qui répondent ou non à un traitement donné [Gam, 2012]. Cette classification est également importante pour la conception de médicaments [Hamdan, 2007]. L'approche protéomique en biologie Humaine présente un intérêt majeur car, selon les estimations, seulement 2% des maladies humaines semblent être dues à un seul gène endommagé. Ainsi les facteurs épigénétiques et environnementaux seraient impliqués à hauteur de 98% dans leur développement [Palzkill T and Kluwer, 2002]. À cet égard, la protéomique peut être utile pour l'identification de protéines qui peuvent potentiellement servir de biomarqueurs associés à des maladies, ou ceux qui participent à la progression de cette dernière. Les études cliniques les plus permanentes en terme de recherche de biomarqueurs protéiques concernent évidemment l'identification et la quantification de biomarqueurs fiables et validés dans des bio-fluides de patients tels que le plasma, le sérum, la salive, l'urine ou les matières fécales car ils sont facilement accessibles et pas ou peu-invasifs [Strimbu and Tavel, 2010 ; Cantor et al., 2015]. Récemment, diverses technologies protéomiques, basées sur la spectrométrie de masse, ont été appliquées à des échantillons plasmatiques dans l'espoir d'identifier de nouveaux biomarqueurs de maladies [Geyer et al., 2017 ; Omenn et al., 2005 ; Honda et al., 2005 ; States et al., 2006 ; Negishi et al., 2009]. Parmi ces technologies, la stratégie « Shotgun » a été rapportée comme la technologie la plus prometteuse en raison de sa haute sensibilité et de sa capacité à identifier de nombreuses protéines en une seule analyse [McDonald and Yates, 2002]. Au sein des techniques de protéomique basées sur la spectrométrie de masse, la stratégie « Shotgun » reste l'approche la plus utilisée. Elle peut être réalisée en utilisant des marquages isotopiques ou isobares (ou en anglais « label-based technologies » ou sans marquage (ou en anglais « label-free MS-based proteomics » [Piovesana et al., 2016]. Cette stratégie « Shotgun » a notamment permis d'identifier des biomarqueurs plasmatiques associés à la toxicité hématologique et la survie des patients atteints de cancer du pancréas recevant un

traitement à la gemcitabine [Matsubara et al., 2009 ; Ohmine et al., 2015] et de cancers colorectaux de types « adénocarcinomes » [Atak et al., 2018].

Récemment, les outils de protéomique ont été introduits en recherche agronomique sur les animaux d'élevage. La recherche protéomique sur les aliments est principalement due au fait que les profils protéiques influencent les propriétés nutritionnelles, rhéologiques et sensorielles des produits alimentaires. Ils sont utilisés comme outils de caractérisation des produits alimentaires, mais également pour évaluer la qualité, la sécurité sanitaire des aliments et pour identifier certaines pathologies [Sauer and Luge, 2015 ; Cunsolo et al., 2014]. Ainsi, la protéomique a permis d'identifier des biomarqueurs plasmatiques potentiels de la « Maladie de Mortellaro » chez les bovins laitiers [Sun et al., 2013a]. Il s'agit d'une maladie infectieuse d'origine bactérienne très contagieuse qui se développe au niveau de la peau des pieds de bovins et entraîne des boîteries. Cette maladie engendre également de lourdes conséquences économiques car elle diminue de 5 à 30% la quantité de lait produite par vache, et implique des réformes prématurées et des problèmes de fertilité dûs à la baisse d'activité de l'animal [Nagaraja et al., 2005]. Aussi, l'approche « Shotgun » a permis d'identifier la parvalbumine, un marqueur d'allergie chez les poissons, comme biomarqueur musculaire surexprimé chez les poissons d'élevage et non chez les poissons sauvages (ex : daurade, saumon) [Piovesana et al., 2016]. Aussi, les approches métabolomiques sont également puissantes, non seulement pour différencier la viande issue de différentes espèces (bovins, porcins et poulets), mais aussi de différentes races bovines. Des prédicteurs métabolites sanguins et musculaires du pHu de la viande de poulet ont été identifiés dans une étude récente [Beauclercq et al., 2016]. Ces auteurs ont rapporté des signatures métabolomiques, dans le sang et dans les muscles, très spécifiques des deux groupes pHu^{+}/pHu^{-} et qui permettent de discriminer de façon très précise les deux groupes. Chez les bovins, la recherche de biomarqueurs plasmatiques liés aux qualités sensorielles de la viande a été initiée par l'analyse protéomique. De plus, des études utilisant des outils de bio-informatique ont permis d'identifier des protéines sécrétées qui pourraient être des candidats potentiels quantifiables dans le plasma [Bonnet et al., 2016]. Ces approches, appliquées au sang, présentent un intérêt considérable car elles permettraient la recherche de biomarqueurs associés aux qualités de viande chez les animaux vivants. D'ailleurs, [Moon et al., 2018] ont identifié des biomarqueurs sanguins associés au score de persillé (corrélation négative avec la teneur en rétinol sanguin) et à la zone musculaire du muscle *Longissimus* (teneur en transaminases ASAT variable) durant la phase de finition de bouvillons Hanwoo. Ces résultats prometteurs en termes de recherche de biomarqueurs « sanguins » permettraient la recherche de biomarqueurs associés aux qualités de viande du vivant de l'animal et de façon peu-invasive.

De nos jours, le plasma, le sérum, ou l'urine sont les échantillons de choix utilisés dans la plupart des études cherchant à identifier des biomarqueurs en biologie humaine. En effet, ces bio-fluides sont très faciles à obtenir et relativement peu-invasifs pour les individus prélevés. Les prélèvements tissulaires, notamment sous forme de biopsies, nécessitent des procédures invasives qui requièrent généralement la mise en place d'anesthésie générale et/ou locale. Il existe cependant des inconvénients à l'utilisation de bio-fluides. Le principal inconvenant réside dans les chances, fortement diminuées, d'identifier un biomarqueur avec une forte spécificité pour le phénotype étudié, ceci particulièrement pour le sérum et le plasma. Les molécules (non cellulaires) du corps sont diluées plus de quatre fois dans la circulation sanguine. De plus, l'un des rôles de la circulation sanguine est de transporter des molécules vers et depuis les cellules, et ceci dans l'ensemble du corps. Ainsi, il est facile de conclure ce qui a été rapporté expérimentalement par [Zhang et al., 2007], à savoir que le protéome de ces bio-fluides est constitué de molécules provenant de cellules du corps entier.

À retenir…

• *Les biomarqueurs sont des « indicateurs biologiques » qui permettent de caractériser un phénotype. Ce dernier est associé à l'état physio-pathologique de l'individu ou de l'animal considéré.*

• *L'identification de nouveaux biomarqueurs réside en une démarche particulière multi-étapes : la phase de découverte, la phase de qualification, la phase de vérification et la phase de validation/développement.*

• *L'identification de biomarqueurs adaptée à l'étude des qualités sensorielles de la viande présente un intérêt particulier pour comprendre les mécanismes biologiques complexes qui sous-tendent le déterminisme et la variabilité de ces qualités.*

• *Des technologies spécifiques sont développées pour l'étude des protéomes ; elles sont notamment basées sur l'utilisation de la spectrométrie de masse.*

• *La stratégie protéomique a permis de cartographier de nombreuses protéines musculaires associées avec les qualités sensorielles, et notamment avec la tendreté de la viande bovine. Il s'agit notamment de protéines du cytosquelette, de protéines en lien avec les systèmes protéolytiques ou avec le métabolisme énergétique du muscle. Il s'agit également de protéines impliquées dans des voies de transport/signalisation, de protéines associées au stress oxydatif/détoxification, de protéines de choc thermique (HSP) et/ou d'inhibiteurs de protéases à sérine (SERPINs)…*

• *L'analyse du protéome musculaire présente des limites : invasivité des prélèvements musculaires (biopsies), détérioration des carcasses, variabilité des biomarqueurs de tendreté en fonction du type de muscle, du type d'animal, de sa race ou encore des pratiques d'élevage et/ou de l'environnement. Ainsi, l'identification de biomarqueurs « génériques », quantifiables à partir de prélèvements plasmatiques (ex : peu-invasifs), apparait donc comme un outil prometteur pour prédire le « potentiel qualité » du vivant de l'animal (en ferme) ou du moins plus précocement (à l'abattoir).*

Synthèse bibliographique

Chapitre 3 : L'agrégation de données publiées pour la découverte de biomarqueurs peu-invasifs

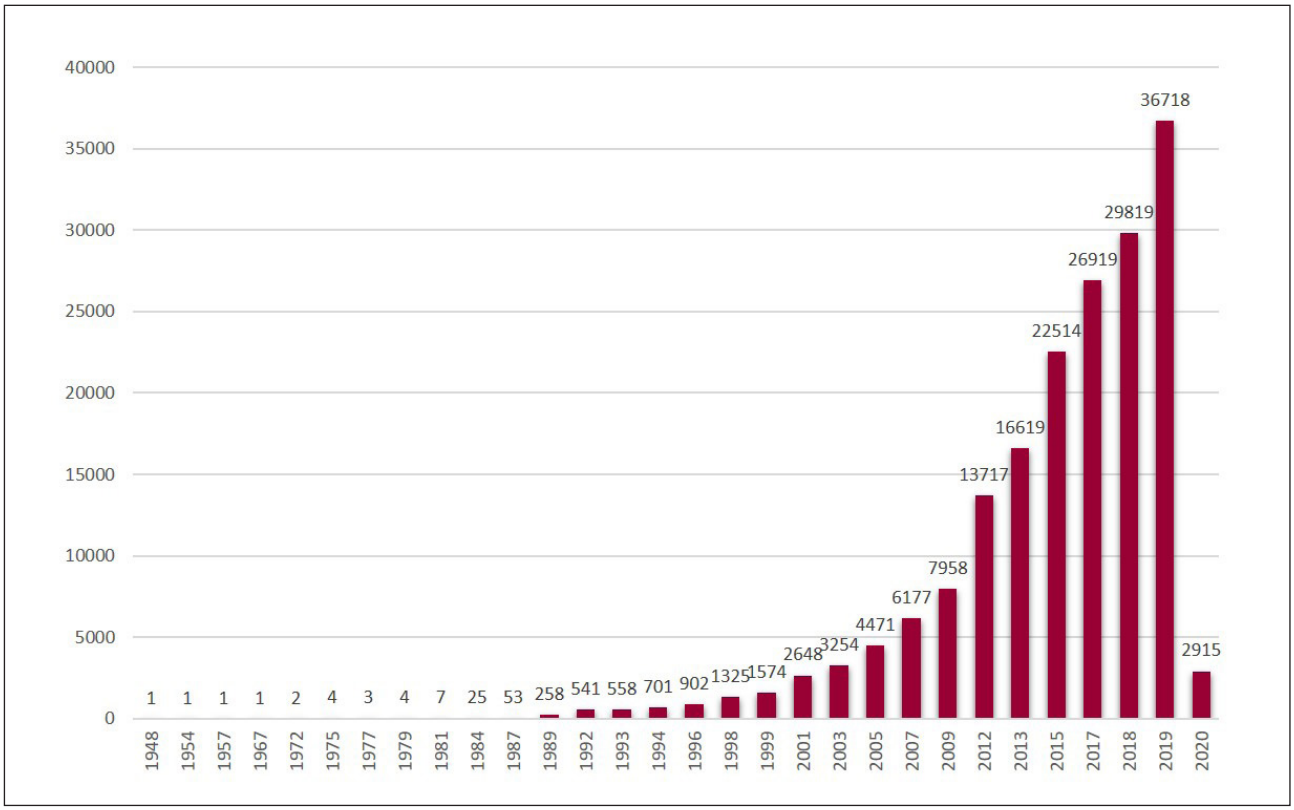


Figure 38. Evolution du nombre de publications traitant de « méta-analyse » ou « revue systématique » entre 1948 et 2020
Source: PubMed (consulté le 10 Janvier 2020)

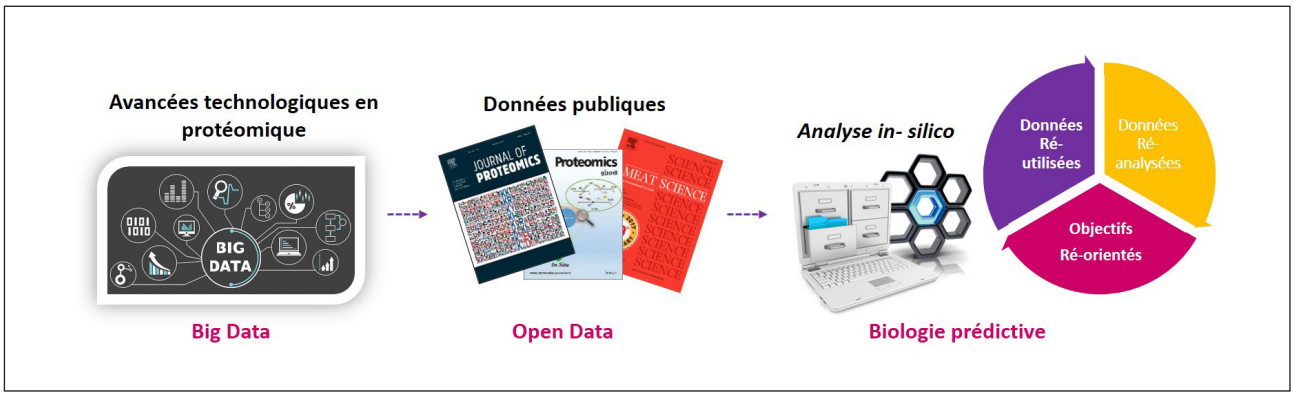


Figure 39. Du Big-Data à la réutilisation de données pour la biologie predictive

Chapitre 3 : L'agrégation de données publiées pour la découverte de biomarqueurs peu-invasifs

Comme décrit au travers des chapitres précédents, la prédiction de la qualité de la viande bovine a fait l'objet de nombreux travaux. Menées au niveau international, ces recherches ont permis de préciser l'influence de différents facteurs sur les caractéristiques du muscle, eux-mêmes à l'origine de la qualité finale de la viande. La variabilité de la tendreté est aujourd'hui au cœur de la recherche pour la filière bovine. Face aux demandes des consommateurs qui cherchent à consommer une viande de qualité régulière et supérieure, la filière de l'élevage bovin recherche des outils fiables pour prédire la qualité et notamment la tendreté de la viande [Verbeke et al., 2010 ; Delerins and Raffard, 2017]. La recherche de biomarqueurs est nécessaire en vue d'élaborer des outils de phénotypage pour évaluer ou prédire la tendreté de la viande. L'accès à ces biomarqueurs doit être facile et peu-invasif pour répondre aux mieux aux besoins de la filière. L'élaboration de tests rapides à partir de biomarqueurs sanguins devrait favoriser l'utilisation de ces tests par les acteurs de terrain (éleveurs ou vétérinaires). Les études qui rapportent des biomarqueurs protéiques associés à la tendreté de la viande sont essentiellement réalisées à partir d'échantillons musculaires. L'agrégation des données de ces études, combinée à une reconstruction du sécrétome musculaire, pourrait permettre de proposer des candidats plasmatiques.

I. L'agrégation de données publiques pour la recherche de biomarqueurs

1. De l'OPEN-DATA à la revue systématique

Historiquement, une grande partie de la communauté était réticente à partager ouvertement les données qu'elle produisait. Cependant, le partage de données entre scientifiques présente de nombreux avantages. En effet, malgré l'hétérogénéité des études et en prenant en compte l'effet expérimentation, rassembler des données de diverses origines permet d'accroitre la puissance statistique des analyses réalisées à partir de leur agrégation. Grâce à un effort mondial pour la transparence scientifique, il est devenu possible et conforme aux attentes du monde scientifique de partager des données expérimentales (ou « DATA SHARING », partage des données) relatives aux nouvelles découvertes [Hrynaszkiewicz, 2010]. En France, la loi pour une République numérique stipule que les données obtenues grâce à des financements publics doivent être rendues publiques (loi n° 2016-1321 du 7 octobre 2016 pour une République numérique). Aujourd'hui, le partage des connaissances (résultats de publications scientifiques), notamment issues d'études protéomiques, ainsi que des données sous-jacentes, est devenu

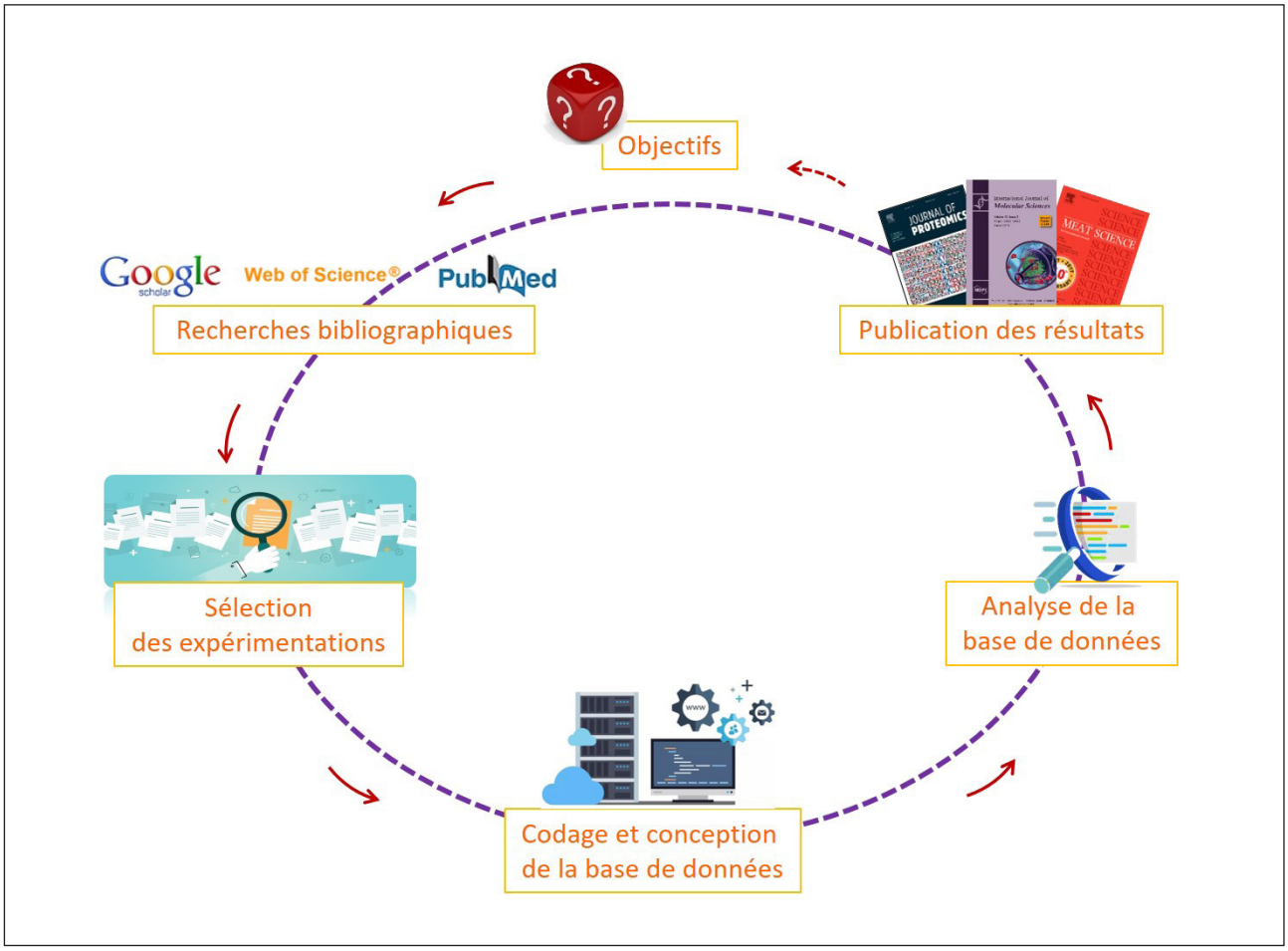


Figure 40. Principales étapes d'une « revue systématique de la littérature »
Adapté de [Sauvant et al., 2005]

de plus en plus courant, voir même obligatoire ou fortement conseillé dans de nombreuses revues scientifiques [Democratizing proteomics data, 2007; Thou shalt share your data, 2008] : c'est la révolution de l'OPEN-DATA (ouverture des données). L'émergence des nouvelles technologies en protéomique et leur automatisation a conduit à augmenter considérablement le volume des données omiques accessibles au public : on parle de « BIG DATA » **(Figure 38)**. Cependant, une grande partie de ces données reste encore inexploitée. Dans un contexte où l'on tend à diminuer au maximum les expérimentations sur l'animal, la communauté scientifique cherche à réutiliser ces données pour faire de nouvelles découvertes. La réutilisation de données est un concept qui est de plus en plus couramment utilisé. Evoquées pour la première fois en 2013 pour des données transcriptomiques [Rung and Brazma, 2013], la réutilisation et l'exploration de données protéomiques offrent toutes deux des possibilités d'analyse computationnelle pour de la biologie prédictive *in-silico* [Vaudel et al., 2016] **(Figure 39)**. Sans faire appel à de nouvelles expérimentations, la réutilisation de données permet d'apporter de nouvelles connaissances pour la compréhension de phénotypes biologiques, tout en affinant des hypothèses de recherche. Ces finalités sont en accord avec le fondement de la démarche éthique appliqué à l'expérimentation animale : le principe des 3 R pour **R**éduction (du nombre d'animaux), **R**affinement (amélioration des techniques), **R**emplacement (développement de techniques substitutives). La réutilisation et le traitement des données « omiques » agrégées peut être réalisé selon deux stratégies : une revue systématique de la littérature (qualitative) ou une méta-analyse (quantitative).

La revue systématique de la littérature est une démarche qui consiste à rassembler les résultats provenant de multiples études scientifiques distinctes traitant chacune d'un sujet spécifique [Sauvant et al., 2005]. Dans ce cas, le rassemblement de plusieurs publications peut permettre de donner plus de sens à ces caractéristiques et d'en déduire de nouvelles réponses ou pistes de travail qu'aucune des études prises séparément ne pourrait fournir [D'Agostino and Weintraub, 1995; Vaudel et al., 2016] **(Figure 40)**. La méta-analyse permet d'augmenter la puissance statistique d'un résultat en augmentant le nombre d'observations et de générer des modèles de prédiction. En effet, si on dispose de réponses individuelles à un ou plusieurs facteurs, les modèles obtenus auront une portée plus générale que si elles étaient traitées indépendamment. Enfin, elle favorise l'exploration et la valorisation d'informations « mineures » (caractéristiques peu mesurées ou ayant un intérêt secondaire à l'échelle d'une seule expérimentation). Mes travaux de thèse se sont articulés autour d'une « revue systématique de la littérature ».

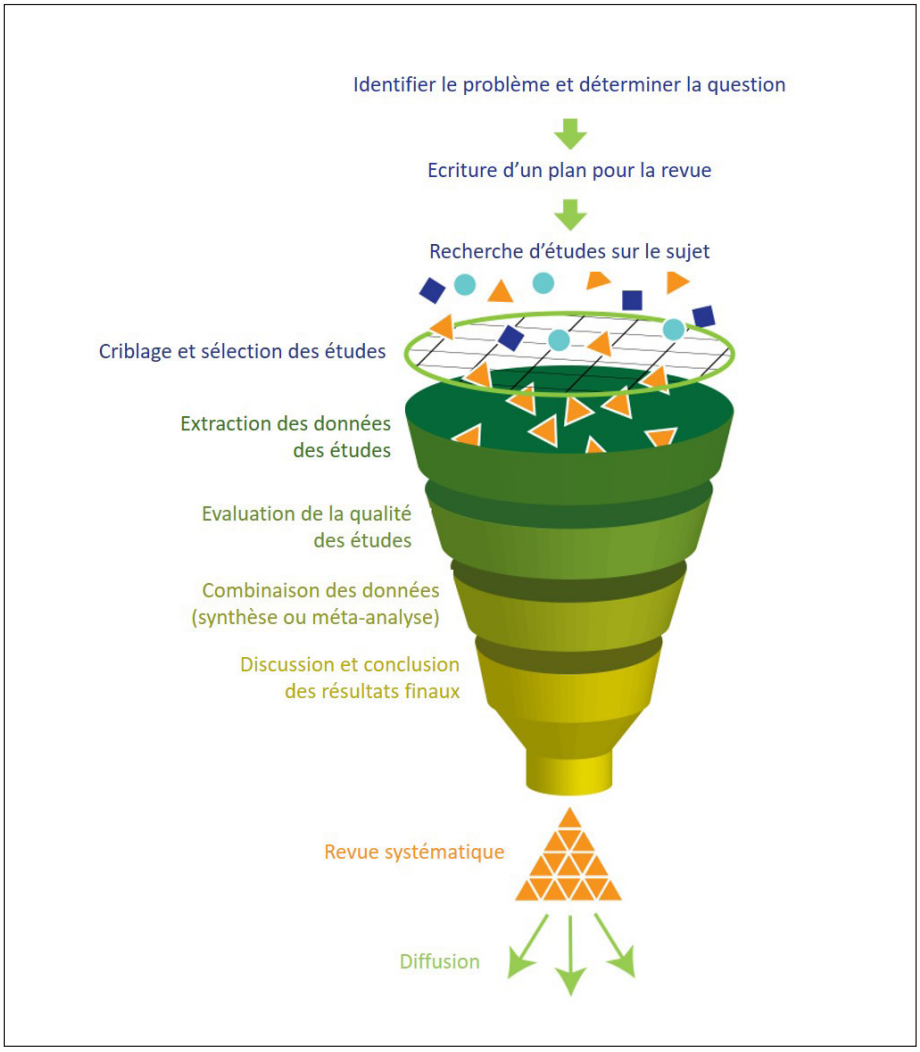


Figure 41. Démarche suivie par les auteurs d'une revue systématique de la littérature ou méta-analyse
Une revue systématique correspond à une synthèse rigoureuse et reproductible des résultats de toutes les études originales existantes répondant à une même question de recherche (qualitative). Une méta-analyse correspond à une synthèse statistique des études incluses dans la revue systématique (quantitative).

2. Les principales étapes de la revue systématique

La recherche d'articles dans la littérature fait partie depuis toujours du travail du chercheur. Cependant, cette recherche n'inclut pas de règles formelles sur le choix des articles et des études sélectionnées, ni sur la manière de résumer l'information et de retenir certains résultats plutôt que d'autres. Dans ces conditions, les conclusions des auteurs de ces publications peuvent jouer un rôle dans le choix des articles sélectionnés. La revue systématisée de la littérature consiste à apporter une méthodologie formelle **(Figure 41)**, afin de rassembler et d'analyser des données de différentes études sélectionnées de façon objective selon 5 critères [Sauvant et al., 2005] :

1- Il s'agit de repérer l'ensemble des publications pertinentes, relatives à la question de recherche.

2- La revue doit être exhaustive et de qualité, réalisée de façon rigoureuse afin de réduire au maximum le risque de biais.

3- Elle doit être réalisée de façon transparente, être décrite (via un protocole) pour pouvoir être évaluée par le lecteur et être reproductible.

4- Elle doit être actualisée régulièrement au travers d'une veille périodique.

5- Elle doit être réalisée en interrogeant au moins deux bases de données (ex : Web of Science, Medline, Embase, Google Scholar…).

La définition de critères de sélection diffère en fonction de la question posée par la « revue systématique de la littérature » ou par la « méta-analyse ». Cet aspect sera abordé dans le paragraphe I-c

a) Définir le(s) objectif(s)

Il est tout d'abord essentiel de définir la question ciblée à laquelle on souhaite répondre à l'aide de la « revue systématique de la littérature ». Cette étape est primordiale car elle va permettre de construire efficacement le corpus d'articles et de définir le codage de la base de données lors de sa conception. Les objectifs portent soit sur une étude exploratoire (« revue systématique de la littérature » au sens strict), soit à une estimation chiffrée de l'effet d'une variable particulière. Dans ce dernier cas, on utilisera la « méta-analyse » associée à la « revue systématique de la littérature ». La méta-analyse permet notamment d'augmenter la puissance statistique d'un résultat en augmentant le nombre d'observations.

Type de Participants :

Type d'Intervention/Exposition :

Comparaisons :

Type de résultats (Outcomes) :

Type d'études (optionnel) :

Figure 42. Méthode PI(E)CO pour définir la question d'intérêt d'une revue systématique de la littérature
Les critères PICOT peuvent aussi servir à structurer l'évaluation à d'autres étapes de production, soit lors de la précision de la question.

b) La recherche bibliographique

Pour répondre à ces objectifs, une « revue systématique de la littérature » doit porter sur l'exhaustivité des études incluses dans le corpus d'articles en utilisant la méthode PI(E)CO qui permet de formuler la question d'intérêt **(Figure 42)**. Cette façon de décrire les questions amène les chercheurs à réaliser des « revues systématiques » en précisant clairement les composantes centrales de cette dernière. La fouille de données bibliographiques est une étape capitale qui peut être soumise à certains biais. En effet, comme a pu le montrer [Simes, 1986] pour des essais cliniques, si une minorité d'études ont des résultats différents de ceux de la majorité des études incluses dans la revue de la littérature, on assiste au « phénomène de l'iceberg » qui noie les résultats mineurs et la revue est dite « narrative » et non « systématique ». On distingue plusieurs types de « revue systématique de la littérature » ou « méta-analyse », selon si elles concernent les études publiées seulement, les études publiées et non publiées, les démarches prospectives ou les études sur des données individuelles. L'exhaustivité restant le premier principe à respecter. La revue systématique de la littérature que j'ai réalisée durant ma thèse a été construite à partir d'études publiées.

La recherche de travaux scientifiques est menée à partir des moteurs de recherches indexant des bases de données bibliographiques publiques (Google Scholar) ou avec un accès payant par abonnements aux revues scientifiques (Medline, Web of science...), à partir d'articles originaux en libre accès, de résumés de communications à des congrès ou d'études omiques présentes dans les bases de données (ex : GEO). Il est impératif de consulter à minima 2 bases de données différentes pour adhérer au mieux au principe d'exhaustivité. D'un point de vue traçabilité, la liste des moyens mis en œuvre pour cette recherche d'études doit être décrite dans un protocole (bases de données interrogées, date de la recherche, thésaurus et connecteurs booléens utilisés,...). Il convient également de préciser les critères qui autorisent à mettre fin à la procédure de recherche (date ou autres critères (ex : race, sexe…)). La détermination d'une date butoir est nécessaire car, en général, il est très difficile de garantir l'exhaustivité d'une recherche dans les derniers mois qui précèdent sa clôture (délai d'enregistrement des références dans les bases informatisées par exemple). Cette date butoir fixe la date de publication au-delà de laquelle des études, mêmes identifiées, ne seront plus prises en considération.

c) Critères de sélection des études

Après la collecte de l'ensemble des études scientifiques répondant aux objectifs fixés, il faut sélectionner les études à inclure dans la « revue systématique de la littérature » et/ou la « méta-analyse ». Cette étape est cruciale et doit impérativement éviter les choix subjectifs. Pour cela, les études sont classées en fonction de critères d'inclusion et d'exclusion préalablement définis en réponse à ce type d'interrogations (non exhaustives) :

• L'étude entre-t-elle strictement dans le domaine d'intérêt concerné par la revue systématique de la littérature ?

• L'étude répond-elle aux critères de qualité exigibles pour être incluse ? Ces critères peuvent être le type de source de données (articles originaux, résumés,…), langage, période,…

La qualité des études (qualité méthodologique, randomisation, seuil de significativité…) est aussi un critère de sélection très important. L'ensemble des études sélectionnées peut être enregistré dans une base de données qui sera le support de la « revue systématique de la littérature » et/ou de la « méta-analyse ».

L'évaluation du biais correspond à évaluer le risque de sur- ou de sous-estimation de l'effet de l'intervention. Il peut s'agir de : (i) biais dans la sélection des participants à l'étude ; (ii) biais dans la classification des expositions ; (iii) biais dû aux écarts par rapport aux expositions prévues ; (iv) biais dû aux données manquantes ; (v) biais dans la mesure des résultats ; (vi) biais dans la sélection des résultats rapportés ; (vii) financement de l'étude par un industriel ; (viii) risque de concevoir l'étude de manière à orienter favorablement le résultat pour le produit (ou défavorablement pour le contrôle ou contre-produit).

d) Catégorisation des données et conception de la base

Il est nécessaire de catégoriser les études/publications prises en sélectionnées pour créer la base de données. La catégorisation des données est indispensable pour éviter d'interpréter des ensembles de données au sein desquelles plusieurs objectifs expérimentaux sont confondus [Sauvant et al., 2005]. En effet, les expérimentations rapportées dans ces études ont des objectifs différents et s'appuient sur des méthodologies différentes (analyse protéomique, transcriptomique, polymorphisme génétique…). Dans certaines situations, il peut s'avérer nécessaire de transformer des variables, ou d'homogénéiser des identifiants (ex : identifiant protéique « Gene Name »). Il est également important d'inclure dans la base

de données toutes les informations disponibles relatives à l'étude elle-même (ex : tissu, méthode utilisée, prélèvement particulier,…), mais aussi relative au contexte de l'étude (ex : année de la publication, équipe de recherche, auteur principal, DOI).

L'analyse des besoins en fonction des objectifs de la « revue systématique de la littérature » et/ou « méta-analyse » va guider la conception de la base de données. La base de données construite au cours de la « revue systématique de la littérature » et/ou « méta-analyse » est souvent construite sur des « aller-retour ». En effet, bien que l'on définisse les données à intégrer avant de débuter la recherche bibliographique, on se rend parfois compte, au cours de celle-ci, que d'autres données seraient intéressantes ; ainsi on retourne les chercher pour l'ensemble des études agrégées dans la base : il peut s'agir des identifiants protéiques, de l'espèce, du type de muscle, de la méthodologie utilisée…

e) Analyse de la base de données

C'est selon ce type de revue systématique de la littérature que [Delosière et al., 2019] ont agrégé des données publiées sur le protéome du lait de vache pour répertorier toutes les protéines présentes, indépendamment de leur abondance et sans analyse statistique. C'est également selon ce type de « revue systématique de la littérature » associée à une « méta-analyse » que [Bonnet et al., 2016] ont exploré des données transcriptomiques et protéomiques pour prédire le sécrétome du tissu adipeux et du muscle de ruminant.

f) Les limites de la revue systématique

Les résultats de la « revue systématique de la littérature » reposent sur l'importance de l'information et sur la qualité des études retenues pour répondre aux objectifs identifiés. L'exhaustivité et la sélection rigoureuse des études représentent donc « les fondations » de cette démarche. La diversité des résultats fournie par les études amène l'analyste à considérer chaque étude et à statuer sur son intérêt au cas par cas, car le mélange d'études ou de populations diverses peut s'avérer non pertinent et produire des résultats dénués de signification. Une autre limite de la méta-analyse réside dans le biais de « subjectivité » lors de la sélection des études. Cette étape reste très délicate et ne doit pas être négligée. En effet, [Van den Bergh et al., 1997] rappellent que « même si la méta-analyse peut réduire le degré de subjectivité par rapport à une revue de la littérature habituelle […], elle ne peut pas la faire disparaître ». Il est recommandé de réaliser une lecture de chaque étude par deux analystes distincts qui catégorisent l'étude chacun de leur côté, puis de recouper leurs choix et de statuer sur la catégorisation finale. La « revue systématique de la

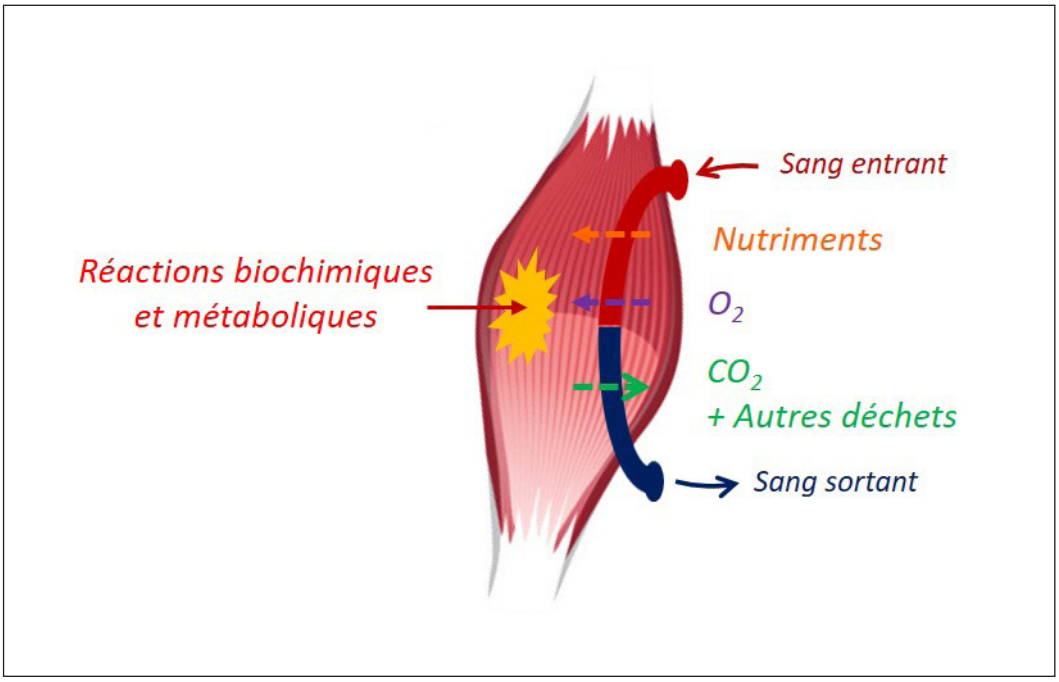


Figure 43. Les échanges au niveau du muscle strié squelettique
Les muscles prélèvent en permanence dans le sang du glucose et de l'O_2.
Ils y rejettent du CO_2.

littérature », basée uniquement sur des articles publiés dans des revues à comité de lectures, présente par conséquent un « biais de publication » résultant de l'exclusion des études non publiées, par exemple due à la disponibilité des données. En effet, selon [Gene V Glass, 2000], « cette omission revient à considérer que les résultats sont similaires en taille et en nature, qu'ils soient publiés ou non ». Cependant ceci n'est pas toujours le cas, ce qui pousse l'analyste à poser des hypothèses par rapport aux résultats obtenus. Il faut toujours garder un esprit critique quant aux résultats de la « revue systématique de la littérature » et de la « méta-analyse, », car seul des résultats issus d'analyses expérimentales permettront de valider les conclusions de l'analyse. Le muscle : un tissu sécréteur source de biomarqueurs plasmatiques peu-invasifs ?

Les muscles squelettiques représentent l'organe le plus vaste du corps des mammifères. Les muscles, comme tous les organes, sont irrigués et reçoivent du sang par l'intermédiaire des vaisseaux sanguins. Les échanges entre les organes et le sang ont lieu au niveau de vaisseaux sanguins très fins : les capillaires sanguins **(Figure 43)**. Le muscle squelettique ne se résume pas à être un simple système locomoteur. De récentes études ont décrit le muscle squelettique comme un organe sécrétoire, capable de sécréter des protéines (ou « myokines ») en réponse à la contraction des fibres musculaires [Pedersen et al., 2007]. Dans la grande famille des cytokines, les myokines seraient capables d'influencer le métabolisme du muscle lui-même mais également celui d'autres tissus ou organes tels que le tissu adipeux, le foie, le pancréas, l'os et le cerveau [Pedersen, 2013]. Les myokines permettent la communication cellulaire selon plusieurs modes : « autocrine » (action sur la cellule elle-même), « paracrine » (action sur les cellules voisines), ou « endocrine » (action à distance). Le muscle squelettique, en tant que « producteur de myokines », a fait l'objet de plusieurs études qui ont montré le rôle de cet organe sécréteur dans les changements immunitaires liés à l'exercice physique, mais aussi son rôle dans les changements métaboliques [Pedersen and Febbraio, 2012]. Le sécrétome musculaire se compose de plusieurs centaines de protéines [Bortoluzzi et al., 2005 ; Henningsen et al., 2010].

Adapté à mon objectif de recherche, nous avons fait l'hypothèse que l'étude du sécrétome musculaire pourrait permettre d'identifier des biomarqueurs peu-invasifs, notamment plasmatiques, pour évaluer ou prédire la tendreté de la viande.

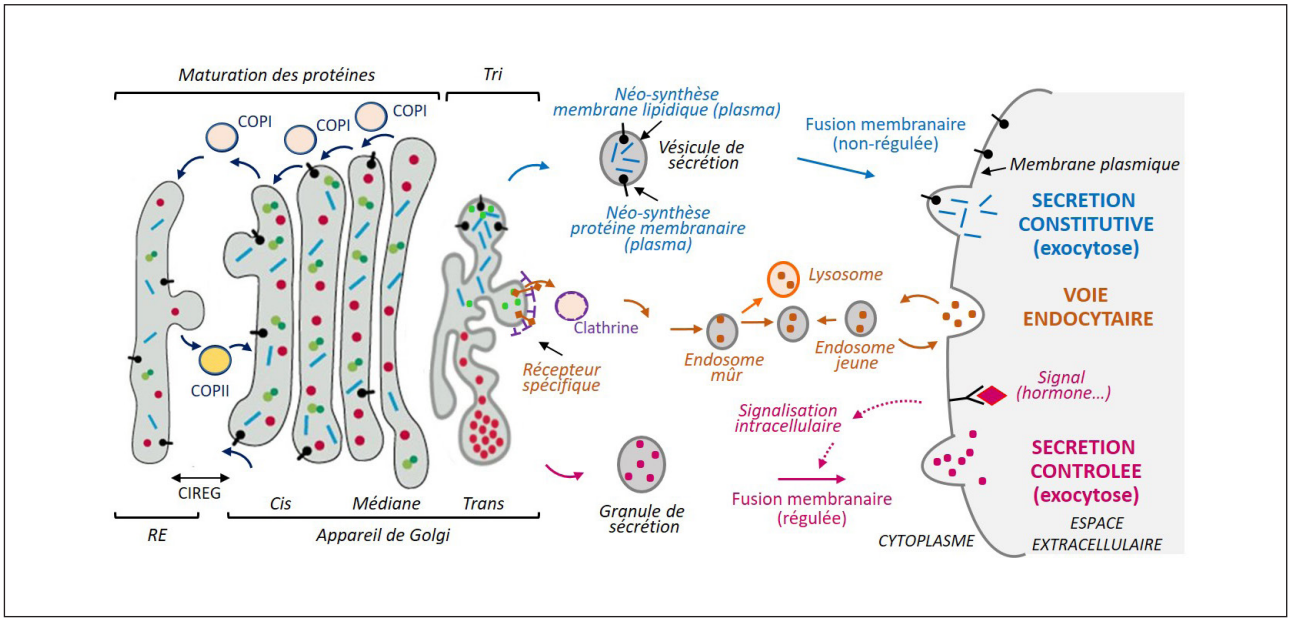


Figure 44. Schématisation des voies classiques de sécrétion

(1) La sécrétion constitutive ou les protéines (ou autres molécules) sont transportées dans des vésicules sécrétoires depuis leur site de synthèse (le réticulum endoplasmique, ou RE), directement dans l'espace intracellulaire. Ce mode de sécrétion est principalement utilisé pour le renouvellement membranaire et de la matrice extracellulaire (en bleu).

(2) La sécrétion contrôlée ou les protéines (ou autres molécules) sont stockées dans des granules de sécrétion. Elles ne seront relarguées qu'en réponse à un stimulus particulier (ex : hormones, neurotransmetteurs…). Ce sont les protéines solubles qui sont excrétées de la cellule. Les protéines intrinsèques et les protéines solubles des compartiments cellulaires sont entourées d'une endomembrane (en rose).

(3) Alors que des protéines sortent de la cellule par des voies sécrétoires, la voie endocytaire permet de faire rentrer des molécules dans cette dernière. Ainsi, des molécules extracellulaires sont internalisées dans des compartiments particuliers tels que les endosomes ou les lysosomes situés dans le cytoplasme de la cellule (en marron).

II. La sécrétion des protéines

Outre leur noyau, la complexité des cellules eucaryotes repose sur la présence de plusieurs types d'organites bordés d'une ou de plusieurs membranes. Cette compartimentation permet à la cellule de cloisonner les différentes activités métaboliques et ainsi fonctionner efficacement. Dans chaque cellule, la synthèse des protéines (ou « traduction ») est assurée par une machinerie très sophistiquée : les ribosomes. Une fois synthétisées, les protéines doivent rejoindre des sites très divers de la cellule ou de son environnement. Un système de tri et d'acheminement est donc nécessaire pour assurer le transport de ces protéines jusqu'à leur lieu de destination. La majorité des protéines sécrétées sont exportées via la « voie classique » (ou « conventionnelle ») dépendante du Réticulum Endoplasmique (RE) et de l'appareil de Golgi (ou RE/Golgi dépendant). Toutefois, certaines protéines sont sécrétées selon une voie dite « non-conventionnelle » (ou « alternative ») indépendamment de l'appareil de Golgi. Ces voies non-conventionnelles sont également appelées UPS pour l'anglais « Unconventional Protein Secretion ».

1. Les voies conventionnelles de sécrétion

Les voies de sécrétion « conventionnelles » (ou classiques) permettent, par l'intermédiaire de vésicules de sécrétion, de transporter des protéines « étiquetées » au travers de plusieurs organites cytoplasmiques spécifiques **(Figure 44)**. Ces organites membranaires : le RE, l'appareil de Golgi (Golgi), les endosomes, les lysosomes et les vésicules sécrétoires, forment un réseau au sein duquel les protéines (et autres molécules) sont transportées d'un organite à un autre dans la cellule (via l'endocytose ou l'exocytose) [Palade, 1975 ; Kelly, 1985]. L'endocytose est principalement un processus par lequel la cellule fait entrer des récepteurs de la surface extracellulaire ainsi que les ligands qui y sont liés. Le transport des protéines par exocytose s'effectue par l'intermédiaire de vésicules de transport qui se forment par bourgeonnement membranaire de compartiment cellulaire **(Figure 44)**. Des cycles répétés de bourgeonnement et de fusion permettent le transport des protéines n'importe où dans la cellule. Une voie biologique synthétique peut être distinguée : les protéines synthétisées dans le RE sont modifiées au cours de leur transit dans l'appareil de Golgi avant d'être transportées dans le cytoplasme vers plusieurs destinations comme la MP ou le lysosome. Ce système de transport est appelé « système sécrétoire » car beaucoup de protéines synthétisées au sein du RE sont destinées à être relarguées par exocytose dans le milieu extracellulaire. Deux types d'activité sécrétoire peuvent être distingués **(Figure 44)**. **La sécrétion constitutive** où les protéines (ou autres molécules) sont transportées dans des vésicules sécrétoires depuis leur site de synthèse (le RE), directement dans l'espace intracellulaire. Ce mode de sécrétion est

principalement utilisé pour le renouvellement membranaire et de la matrice extracellulaire. **La sécrétion contrôlée** où les protéines (ou autres molécules) sont stockées dans des granules de sécrétion. Elles ne seront relarguées qu'en réponse à un stimulus particulier (ex : hormones, neurotransmetteurs,…). Ce sont les protéines solubles qui sont excrétées de la cellule. Les protéines intrinsèques et les protéines solubles des compartiments cellulaires sont entourées d'une endomembrane. Alors que des protéines sortent de la cellule par des voies sécrétoires, **la voie endocytaire** permet de faire rentrer des molécules dans la cellule **(Figure 44)**. Ainsi, des molécules extracellulaires sont internalisées dans des compartiments particuliers tels que les endosomes ou les lysosomes situés dans le cytoplasme de la cellule.

La plupart des protéines sécrétées sont ensuite dirigées vers leur destination cellulaire grâce à des signaux de tri et d'adressage particuliers (3-30 acides aminés) qui sont codés par leur séquence peptidique. Une première « étiquette » porte sur l'éventuelle présence d'une séquence linéaire hydrophobe N-terminale (séquence signal ou Signal-P) qui sert d'ancrage sur le REr [Walter and Blobel, 1982]. Cette séquence particulière est responsable d'un tri qualifié de *« co-traductionnel »* car il s'effectue alors que les protéines sont encore en cours de synthèse. Une seconde « étiquette » porte sur l'éventuelle présence d'autres séquences (non obligatoirement N-terminales, hydrophobes et/ou linéaires) qui serviront à déterminer, de plus en plus précisément, la position de la protéine en cours de son transport et jusqu'à sa destination définitive. Cette séquence particulière, ou « peptide de destination » (target peptide ou Target-P), est responsable d'un tri qualifié de « *post-traductionnel* » [Stefanovic and Hegde, 2007]. Ces signaux de tri sont identifiés par des récepteurs membranaires spécifiques logés dans des membranes vésiculaires en bourgeonnement. Ils assurent ainsi le transport de la protéine vers la bonne destination cellulaire.

Ces signaux dirigent le tri des protéines dès leur sortie du réticulum endoplasmique (RE). À partir du RE, les protéines « étiquetées » sont transportées dans l'espace extracellulaire ou à la membrane plasmatique au travers d'une voie de sécrétion classique (ou conventionnelle) dépendante du RE et de l'appareil de Golgi (ou RE/Golgi dépendante) **(Figure 44)**.

Les protéines entrent dans le RE sous forme de protéines néo-synthétisées via la particule de reconnaissance Signal-P. Les protéines sortent ensuite du RE au niveau des domaines membranaires spécialisés appelés « sites de sortie » (ou « ERES » pour Endoplasmic Reticulum Exit Sites), d'où se forment des vésicules tapissées de protéines particulières COPII (ou COPII-coated vesicles). Parmi ces protéines COPII, on retrouve des protéines à activité ATPase telles la Protéine G (Sar1), Sec23, Sec24, Sec13, Sec31 qui assurent, par reconnaissance des signaux « d'exportation du RE » dans leur séquence

polypeptidique, le choix des protéines à transporter dans la vésicule tapissée COPII [Miller et al., 2003 ; Barlowe et al., 1994 ; Otte and Barlowe, 2004]. Les protéines néo-synthétisées atteignent ensuite l'appareil Golgi, où elles sont modifiées, traitées, triées et expédiées vers leur destination finale.

Le transport des protéines selon la voie classique de sécrétion dépend de la formation de vésicules intermédiaires tapissées de protéine COPI (ou COPI-coated vesicles). Parmi ces protéines COPI, on retrouve des protéines particulières telles que la protéine GTPase ADP-ribosylation factor 1 (ARF1) ou le « coatomère », un complexe protéique heptamérique. Les vésicules COPI sont principalement formées dans l'appareil de Golgi et conditionnent le retour des protéines du Trans-Golgi au Cis-Golgi et vers le RE (mode « rétrograde » ou « centripète ») [Rabouille and Klumperman, 2005], ainsi que le mouvement antérograde (« ou centrifuge ») de certaines protéines ou autres composants [Pelham and Rothman, 2000].

La voie de sécrétion classique implique une série d'événements de fusion entre des vésicules intermédiaires (ou vésicule de transport) et des organites cytoplasmiques. Ces phénomènes de fusion sont catalysés par des protéines particulières : les protéines SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) accessory protein (SNAP) receptors). La fusion membranaire est permise par la formation d'un complexe trans-SNARE formé de faisceaux d'hélice-α reliés aux domaines cytoplasmiques SNARE. La membrane opposée est amenée à proximité, ce qui finit par entraîner la fusion de la membrane. Le complexe trans-SNARE est ensuite dissocié par l'activité ATPase de la NSF qui se lie au complexe via SNAP. Cela permet le recyclage des SNAREs et leur réutilisation pour de futurs autres transports vésiculaires. La Syntaxin 5 est un exemple de protéine SNARE qui s'est révélée cruciale pour le transport vers et à travers le Golgi dans tous les systèmes modèles [Pelham, 2001 ; Mellman and Warren, 2000].

2. Les voies de sécrétion non-conventionnelles (ou UPS)

Un *consensus* vieux de 50 ans précise que les protéines sécrétées et les protéines membranaires atteignent leur destination cellulaire en utilisant la voie de sécrétion « classique » (ou « conventionnelle »). Brièvement, ces protéines sont porteuses d'une séquence peptide signal (ou « Signal-P ») et/ou d'un domaine transmembranaire qui orientent leur transport vers le RE. Elles sortent ensuite du RE au sein d'une vésicule tapissées de protéines COPII, avant de rejoindre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique [Palade, 1975 ; Ferro-Novick and Brose, 2013]. Cependant, les recherches menées au cours des 15 dernières années montrent que les protéines peuvent également être adressées à la membrane plasmique et/ou au milieu extracellulaire, en contournant cette voie classique de sécrétion dépendant du

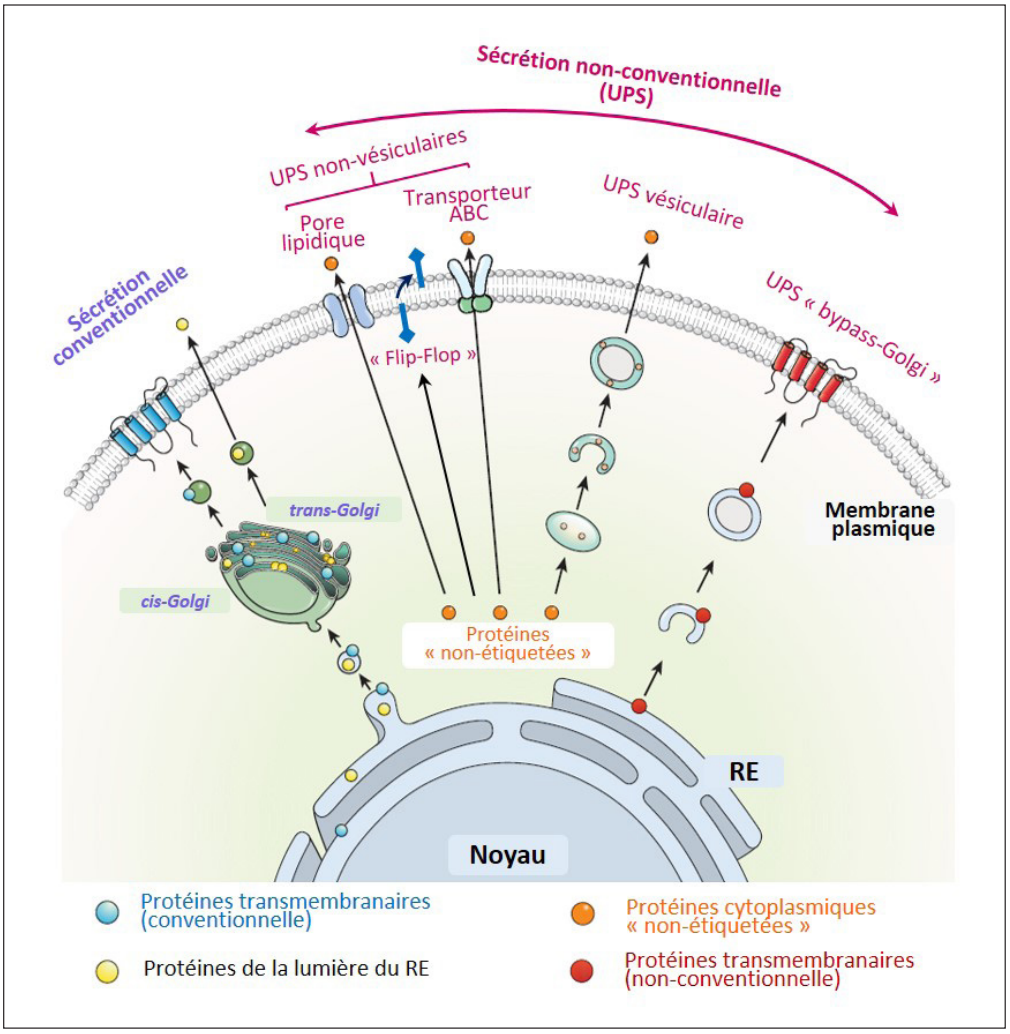


Figure 45. Voies de sécrétion des protéines

La sécrétion conventionnelle (en violet) implique le transport du Réticulum Endoplasmique (RE) vers l'appareil de Golgi (RE/Golgi dépendante) de protéines transmembranaires (rond bleu) et des protéines intrinsèques au RE (rond jaune), toutes deux « étiquetées » par une séquence Signal-P et/ou domaine transmembranaire. D'autres protéines utilisent les voies de sécrétions non-conventionnelles (ou UPS) indépendantes du RE/Golgi (en fushia). Les protéines cytoplasmiques « non-étiquetées » (rond orange) peuvent être sécrétées de la cellule par des voies non-vésiculaires au travers d'un pore membranaire ou d'un transporteur ABC. D'autres protéines cytoplasmiques « non-étiquetées » peuvent être sécrétées de la cellule en utilisant des vésicules intracellulaires associées à l'autophagie telles que les lysosomes ou endosomes (UPS vésiculaire). Le mécanisme de « flip-flop » permet aux protéines d'être ancrées à la membrane par une double acylation au niveau de son extrémité N-terminale, puis par un phénomène de « bascule » de libérer la protéine dans le milieu extracellulaire. Des protéines transmembranaires « étiquetées » (rond rouge) peuvent atteindre la membrane plasmique en contournant l'appareil de Golgi (UPS « bypass-Golgi »).

RE et de l'appareil de Golgi (ou voie RE/Golgi dépendante) : on parle ainsi de voies non-conventionnelles (voies alternatives ou UPS pour l'anglais « Unconventional Protein Secretion ») **(Figure 45)** [Rabouille et al., 2012].

Deux catégories de protéines peuvent être sécrétées de façon non-conventionnelle : (i) les protéines cytoplasmiques, non-porteuses d'une séquence « Signal-P » et/ou de domaine transmembranaire, qui sont capables de traverser la membrane plasmique pour être actives dans le milieu extracellulaire. Ces protéines peuvent contenir d'autres signaux qui dirigent leur sécrétion et elles peuvent être sécrétées selon trois voies médiées par des mécanismes distincts [Rabouille, 2017] :

- **Les voies non-vésiculaires** incluant (i) la translocation protéique au travers d'un pore membranaire dans la MP (UPS de type I) et (ii) la sécrétion médiée par un transporteur ABC (UPS de type II). Cette voie est spécifique pour la sécrétion de peptides acylés notamment.

- **Les voies vésiculaires** incluant (i) la sécrétion médiée par des vésicules (autophagosome/endosome) (voie de type III) et (ii) la sécrétion impliquant des protéines qui présentent un peptide signal et/ou un domaine transmembranaire, qui rentrent dans le RE mais qui contourne la machinerie de l'appareil de Golgi. Ces protéines décrivent la voie de sécrétion par contournement de l'appareil de Golgi (voie de type IV ou « Golgi-bypass »).

a) Les UPS non-vésiculaires

L'UPS de type I implique la formation de pores lipidiques au niveau de la membrane plasmique pour permettre aux protéines cytoplasmiques « non-étiquetées » de traverser cette dernière afin d'atteindre l'espace extracellulaire. La formation de pores peut être auto-entretenue, induite par l'inflammation ou par le stress. La sécrétion du facteur de croissance fibroblastique (FGF2) est un bon exemple pour décrire cette voie de sécrétion. Bien que la plupart des UPS soient induites par le stress, FGF2 peut être sécrété de façon constitutive [Nickel and Seedorf, 2008 ; Steringer et al., 2015 ; La Venuta et al., 2015]. En effet, il présente la capacité de générer lui-même un pore lipidique au niveau de la membrane plasmique pour lui permettre de rejoindre le milieu extracellulaire **(Figure 40)**. Cette translocation se réalise en quatre étapes : (i) les protéines FGF2 repliées sont recrutées à la membrane plasmique ou elles interagissent avec le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) (coté cytoplasmique) et avec l'héparane sulphate protéoglycane (HSPgs) (coté extracellulaire) [Temmerman et al., 2008 ; Schäfer et al., 2004] ; (ii) cette interaction conduit à la phosphorylation de FGF2 par la Tec-

Kinase [Ebert et al., 2010] ; (iii) la phosphorylation de FGF2 induit ensuite l'auto-oligomérisation du complexe, induite par PIP2, à la membrane plasmique ; (iv) cette oligomérisation va alors entraîner leur insertion dans la membrane plasmique et la formation de pores [Schäfer et al., 2004]. Historiquement, l'UPS de type I a été décrite par la sécrétion constitutive de FGF2. Cependant, l'inflammation peut également induire la formation de pore au niveau de la membrane plasmique. En effet, c'est le mécanisme d'action qui explique la sécrétion l'interleukine cytoplasmique 1β (IL-1β). En réponse à l'inflammation, le précurseur de l'IL-1β est rapidement clivé par la caspase 1. Une fois clivée, la forme mature de l'IL-1β pourra être sécrétée. Ici, c'est le fragment clivé par la caspase 1 qui va être reconnu par le PIP2 et qui va induire la formation d'un pore membranaire, permettant la sécrétion de IL-1β dans l'espace extracellulaire [Rabouille, 2017].

L'UPS de type II concerne les protéines qui, après transit direct vers la membrane plasmique, transitent au travers d'un transporteur spécifique appelé « transporteur ABC » **(Figure 45)**. Cette voie de sécrétion a été initialement décrite chez la levure au travers de l'étude d'un peptide farnésylé (le Facteur-a), une phéromone nécessaire à l'accouplement de *Saccharomyces cerevisiae*. Cette protéine est sécrétée par l'intermédiaire d'un transporteur ABC : le transporteur Ste6p [McGrath and Varshavsky, 1989]. Cette voie de sécrétion permet également l'export protéique, notamment du Facteur-m, chez *Schizosaccharomyces pombe* [Christensen et al., 1997] ou la sécrétion de la protéine HASPB chez *Leishmania*, une protéine acylée et hydrophile nécessaire notamment à la transmission du parasite à l'hôte [Maclean et al., 2012]. Enfin, ce type de transporteur serait également impliqué dans le maintien d'un état physiologique stable chez les vertébrés [UEDA, 2011 ; Dean and Annilo, 2005], mais aussi dans la résistance de certains patients à certains antibiotiques ou chimiothérapies [Gottesman et al., 2002 ; Linton, 2007]. Cependant, la nature des UPS médiées par les transporteurs ABC n'étant pas encore clairement caractérisée, nous considèrerons les voies de sécrétion de « type I » et de « type II » comme la seule catégorie d'UPS dite « non-vésiculaire » [Rabouille, 2017]. Enfin il existe un dernier mécanisme vésiculaire appelé « flip-flop » qui permet aux protéines d'être ancrées à la membrane via une double acylation au niveau de leur extrémité N-terminale. Elles sont ensuite libérées dans le milieu extracellulaire par un phénomène de « bascule » [Nickel, 2003] **(Figure 45)**.

b) Les UPS vésiculaires

Le mode vésiculaire des UPS concerne les protéines cytoplasmiques et transmembranaires sans « étiquette ».

L'UPS de type III est généralement induite par des conditions de stress cellulaire. Elle fait intervenir des systèmes vésiculaires issus d'organites cytoplasmiques tels que les lysosomes, les endosomes ; ces derniers formeront par fusion successive des autophagosomes [Ktistakis and Tooze, 2016] **(Figure 45)**. La notion d'UPS associée au mécanisme d'autophagie est apparue avec l'étude de la protéine ACB1 (Acyl-CoA-binding protein), une protéine de stress sécrétée suite à une privation de glucose chez la levure [Duran et al., 2010]. La protéine ACB1 chez la levure (ACBP chez les mammifères) est une protéine très conservée qui ne présente pas de séquence Signal-P qui lui permettrait de transiter dans le RE par la voie classique de sécrétion. Selon [Duran et al., 2010] et [Manjithaya et al., 2010], la sécrétion de la protéine ACB1 serait dépendante d'un certain nombre de protéines chaperonnes (notamment les protéines ATG), nécessaires à la formation de l'autophagosome. Bien qu'il soit admis que les protéines ATG sont impliquées dans la sécrétion non conventionnelle de plusieurs protéines « non-étiquetées », le rôle des autophagosomes sécréteurs comme médiateurs des UPS est moins clair. En effet, des travaux ont permis de montrer que la sécrétion de ACB1 était strictement dépendante de la protéine GRH1, un membre de la famille des protéines golgiennes GRASP [Rabouille and Linstedt, 2016 ; Duran et al., 2010]. Ces protéines son rapportées comme ayant un rôle important pour l'organisation structurale de l'appareil de Golgi des cellules de mammifères, en particulier pour la formations des citernes golgiennes [Puthenveedu et al., 2006 ; Feinstein and Linstedt, 2008]. Ainsi, ces travaux ont permis de décrire deux processus séquentiels conduisant à la sécrétion de ACB1 : (i) le premier réside en la formation d'un compartiment cytoplasmiques matures contenant GRH1 et un collection de petites vésicules formant ainsi un corps multi-vésiculaire (ou MV) nécessaire au transport des protéines [Berg et al., 1998] ; (ii) la deuxième étape consiste à exporter ACB1 présent dans les MV vers le milieu extracellulaire. Bien que le mécanisme exact demeure inconnu, il est possible que ACB1 transite provisoirement dans un saccule aplati, avant de fusionner avec la membrane plasmique [Manjithaya and Subramani, 2011 ; Curwin et al., 2016] **(Figure 45)**. Chez les mammifères, la sécrétion d'IL-1β suite à une privation de nourriture nécessite également des protéines de la famille GRASP, notamment GRASP55 et GRASP65 [Zhang et al., 2015], avec GRASP55 impliqué dans la formation d'autophagosomes sécrétoires [Dupont et al., 2011 ; Bruns et al., 2011]. Ainsi, en condition de stress, le

complexe IL-1β mature / caspase1 pourrait être capturé dans le cytoplasme au cours de la formation de vésicules internes endosomiques (ou endosomes), elles-mêmes à l'origine de la formation de corps MV qui pourront être libérées, sous forme d'exosomes, dans l'espace extracellulaire [Duran et al., 2010 ; Curwin et al., 2016 ; Lee et al., 2016].

L'UPS de type IV, également induite par des conditions de stress, se distingue des voies de type I et de type III. Les protéines utilisant cette voie de sécrétion présentent des « étiquettes » (Signal-P et/ou domaine transmembranaire), mais elles contournent l'appareil de Golgi avant d'atteindre la membrane plasmique [Grieve and Rabouille, 2011]. Cette UPS est spécifique aux protéines transmembranaires. En effet, une mutation ponctuelle au sein de ces protéines peut empêcher le repliement correct de la protéine dans le RE, ce qui conduit à son accumulation et à l'induction d'un « stress cellulaire » au sein du RE. Le stress du RE induit la sortie de ces protéines mutées du RE et leur adressage à la membrane plasmique, mais sans passer par l'appareil de Golgi. Selon la reconnaissance du mauvais repliement dans le RE, deux voies peuvent être décrites :

• La première machinerie de tri implique des protéines de la famille GRASP, parmi lesquelles la protéine GRASP55 qui s'est révélé nécessaire au contournement de l'appareil de Golgi en présence d'une mutation de la protéine CFTR chez les mammifères [Gee et al., 2011]. En condition non stressante, la protéine GRASP55 forme un homodimère au sein de l'appareil de Golgi. Cependant, en condition de stress cellulaire au sein du RE, GRASP55 va être phosphorylée au niveau de la sérine 441, ce qui entraîne sa monomérisation et sa relocalisation dans le RE [Kim et al., 2016b] **(Figure 45)**. Une fois dans le RE, le monomère de GRASP55 va reconnaitre spécifiquement les protéines mal repliées (ex : CFTR) qui doivent être sécrétées selon une UPS contournant l'appareil de Golgi (ou « Golgi-bypass ») [Rabouille and Linstedt, 2016 ; Gee et al., 2011]. Cette voie implique que les protéines soient intégrées dans des vésicules de transport, possiblement des vésicules tapissées de protéines COPII qui seront ensuite dirigées vers la membrane plasmique (ou éventuellement vers des endosomes [Yoo et al., 2002]) sans passer par l'appareil de Golgi **(Figure 45)**.

• La deuxième machine de tri, contournant l'appareil de Golgi, implique deux protéines HSP70 et sa protéine chaperonne DNAJC14. Nous prendrons l'exemple de la protéine pendrine-H723R (mutée). En condition de stress du RE, la protéine HSP70 est capable d'interagir directement la pendrine-H723R. En parallèle, ce stress induit une augmentation des concentrations de DNAJC14, qui va capturer ce complexe et adresser la pendrine-H723R à la membrane plasmique [Jung et al., 2016].

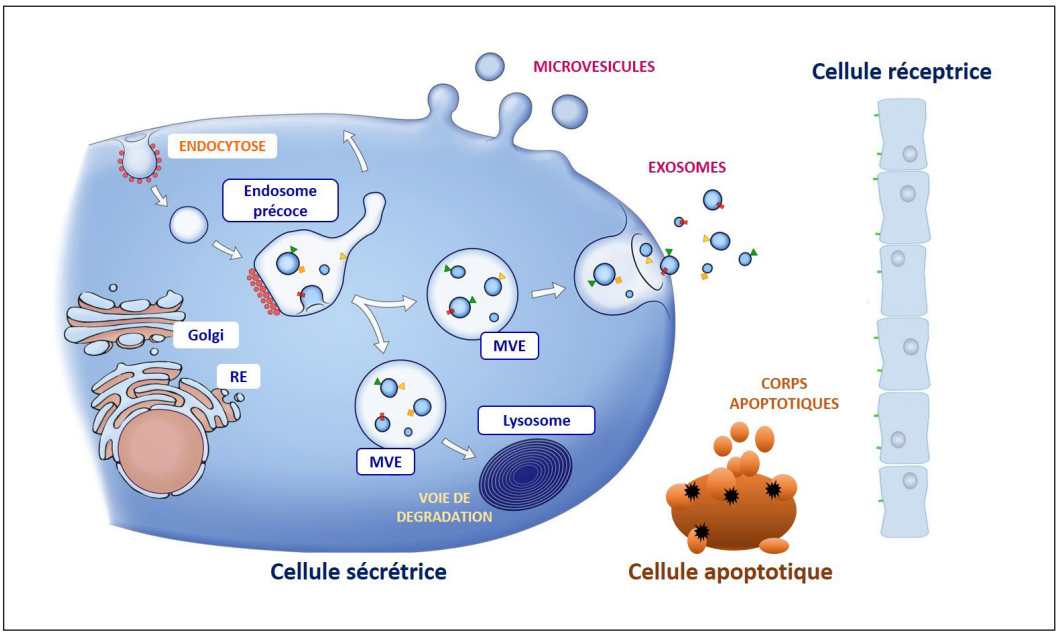


Figure 46. Biogénèse et sécrétion des vésicules extracellulaires
Le système de formation des endosomes repose sur un processus cellulaire appelé « endocytose » qui permet la capture et l'internalisation de différentes molécules présentes dans le milieu extracellulaire et/ou dans la membrane plasmique. Ce système, basé sur une invagination de la membrane permet l'internalisation d'une portion du cytosol, qui contient des molécules diverses (protéines, lipides, couple récepteur/ligand…), au sein de vésicules intra-luminales (ILVs). Ces dernières vont ensuite transiter vers les différents compartiments endosomaux qui sont interconnectés entre eux et subir la maturation endosomale. L'endosome précoce va subir un processus de maturation pour devenir un endosome tardif, puis un endosome multi-vésiculaire (MVE ou « corps multi-vésiculaires »). Les MVB pourront ensuite fusionner avec les lysosomes pour permettre la dégradation de leur contenu ou alors fusionner avec la membrane plasmique pour permettre la libération des ILV dans le milieu extracellulaire : ces vésicules sont alors appelées exosomes.

	Exosomes	Microvésicules	Corps apoptotiques	Références
Taille	30-100 nm	100-1000 nm	1-5 µm	Colombo et al. (2014)
Origine	ILVs dans MVE	MP, composants cellulaires	MP, fragments cellulaire	Camussi et al. (2010)
Mécanisme de formation	Fusion MVE avec la MP	Bourgeonnement direct de la MP	Rétrécissement cellulaire et mort cellulaire	Théry et al. (2009) Simpson et al. (2009)
Sécrétion	Constitutive et/ou stimulée	Constitutive et/ou stimulée	Apoptose	Camussi et al. (2010)
Voies biologiques	ESCRT-dépendant, Tétraspanine-dépendant, Céramide-dépendant, Stimuli-dépendant	Ca^{2+}-dépendent, Stimuli- et cellule-dépendent	Apoptose	Colombo et al. (2014)
Composition membrane lipidique	Enrichie en cholestérol, céramide. Présence de phosphatidyl-sérine transmembranaires et de rafts lipidiques	Enrichie en cholestérol, diacylglycerol. Présence de phosphatidyl-sérine transmembranaires et de rafts lipidiques	-	Colombo et al. (2014)
Contenu	Protéines, ARNm, miRNA, lipides	Protéines, ARNm, miRNA, lipides	Organites cellulaires, protéines, fraction nucléaire, ADN, ARN codants et non-codants, lipides	Colombo et al. (2014)

Tableau 6. Principales caractéristiques des exosomes, microvésicules et corps apoptotiques
Vésicules intra-luminales (ILVs), Endosomes multi-vésiculaires (MVE). Membrane plasmique (MP). ESCRT pour l'anglais "endosomal sorting complex required for transport".

3. Le cas particulier des vésicules extracellulaires

Les vésicules extracellulaires (VEs) font référence à des vésicules dérivées de la membrane cellulaire qui sont sécrétées dans le milieu extracellulaire. Pendant plus de 30 ans, ces VEs ont été considérées comme des convoyeurs de déchets cellulaires qui permettent à la cellule de se débarrasser de molécules nocives ou inutiles [Johnstone et al., 1987]. Elles sont aujourd'hui reconnues comme des vecteurs de matériel biologique impliqués dans le maintien de l'homéostasie et dans la communication cellulaire [Raposo and Stoorvogel, 2013 ; Baixauli et al., 2014 ; Mathivanan et al., 2010]. Les VEs ont été observées pour la première fois dans le plasma il y a 50 ans par Wolf, qui les a appelées «poussière de plaquettes» [Wolf, 1967]. Depuis lors, tous les liquides biologiques testés (sang, urine, salive, lymphe, lait,…) contiennent des vésicules et il a également été démontré que même les lignées cellulaires *in vitro* étaient capables de libérer des vésicules [Raposo and Stoorvogel, 2013 ; Yáñez-Mó et al., 2015]. Etant très hétérogènes en taille et sécrétées par de nombreuses cellules, ces vésicules ont reçu de nombreuses dénominations : exosomes, microvésicules, microparticules, corps apoptotiques, etc… Une nomenclature, récemment proposée par la communauté scientifique internationale, permet aujourd'hui de distinguer trois principaux types de VEs en fonction de leur mécanisme de libération et de leur taille [Lobb et al., 2015] **(Figure 46, Tableau 6)** : les exosomes (30- 100 nm de diamètre), les microvésicules (MV ou microparticules, 100-1000 nm) et les vésicules apoptotiques (ou corps apoptotique, 1-5 µm). Les deux derniers types de vésicules sont libérés directement de la membrane plasmique par les cellules vivantes ou en apoptose, respectivement. Ces dernières années, un intérêt exponentiel pour les microvésicules et les exosomes est apparu en raison de leur rôle dans le maintien d'un état physiologique, et pour le développement de certaines maladies. Des aspects importants de la biogénèse des MVs restent encore inconnus ; ainsi nous résumerons, dans la suite de ce manuscrit, les connaissances actuelles relatives à la formation et à la libération des MVs par les cellules.

a) Les microvésicules

Les microvésicules (MV), souvent appelées microparticules, ont une taille comprise entre 100 et 1000 nm [Théry et al., 2006]. Les MV résultent d'un bourgeonnement de la membrane plasmique, consécutif à un remodelage du cytosquelette lié à une élévation de la concentration en Ca^{2+} cytoplasmique (ex : en réponse à l'activation d'un récepteur cellulaire) [Raposo and Stoorvogel, 2013 ; Zwaal and Schroit, 1997]. Cette augmentation du Ca^{2+} intracellulaire stimule une machinerie enzymatique qui conduit à l'externalisation de la phosphatidylsérine (PS), un phospholipide membranaire, du feuillet interne vers le

feuillet externe de la membrane plasmique [Hugel et al., 2005]. La perte de l'asymétrie de la membrane qui en résulte aboutit à la formation de bourgeons à partir desquels seront émises les MV qui auront séquestrer une portion de cytosol et molécules associées spécifiques que nous détaillerons par la suite [Cocucci et al., 2009]. Cependant, certaines MV ne présentent pas de PS externalisées, ce qui suggère que d'autres mécanismes, encore mal caractérisés, contribueraient à la formation de ces MV. La sécrétion des MV dépend de la voie de signalisation Rho GTPase et de ses kinases associées. Les MV sont sécrétées de façon constitutive, dans des conditions physiologiques, notamment au cours de la croissance cellulaire [Ratajczak et al., 2006]. Les MV, comme les exosomes que nous allons décrire par la suite, participent à la signalisation et la communication cellulaire. Elles permettent à la cellule d'interagir avec son environnement (capture des nutriments, signalisation cellulaire,…). Aussi, elles participent au maintien de l'homéostasie mais elles sont également impliquées dans le développement de certaines pathologies. En effet, dans des cellules spécialisées telles que les plaquettes sanguines, les MV porteuses de PS, au fort potentiel coagulant, suscitent un intérêt comme outil diagnostic de maladies pro-thrombotiques [Hugel et al., 2005].

b) Les vésicules apoptotiques

Les vésicules apoptotiques, aussi appelées « corps apoptotiques », sont libérées par des cellules en apoptose **(Figure 46)**. Ces vésicules, dont la taille varie de 1-5 µm [Théry et al., 2009] contiennent également du cytoplasme contenant des organites et/ou de l'ADN fragmenté [Elmore, 2007] **(Tableau 6)**. Ainsi capables de transférer de l'ADN [Holmgren et al., 1999], elles sont impliquées dans les processus de migration [Berda-Haddad et al., 2011] et de différenciation cellulaire, notamment au sein des cellules endothéliales [Hristov et al., 2004]. Lorsque les vésicules apoptotiques sont capturées par les cellules phagocytaires, elles peuvent présenter des épitopes de lymphocytes T [Bellone et al., 1997] ou des antigènes de lymphocytes B [Cocca et al., 2002]. Elles présentent ainsi également une propriété immunogénique de par leur capacité à induire une réponse lymphocyte T CD8 cytotoxique [Black et al., 2016]. Elles ont été également rapportées comme pouvant contribuer aux thérapies anti-cancers [Muhsin-Sharafaldine et al., 2016], ou dans la réparation tissulaire et l'angiogenèse au cours de l'athérosclérose [Zernecke et al., 2009].

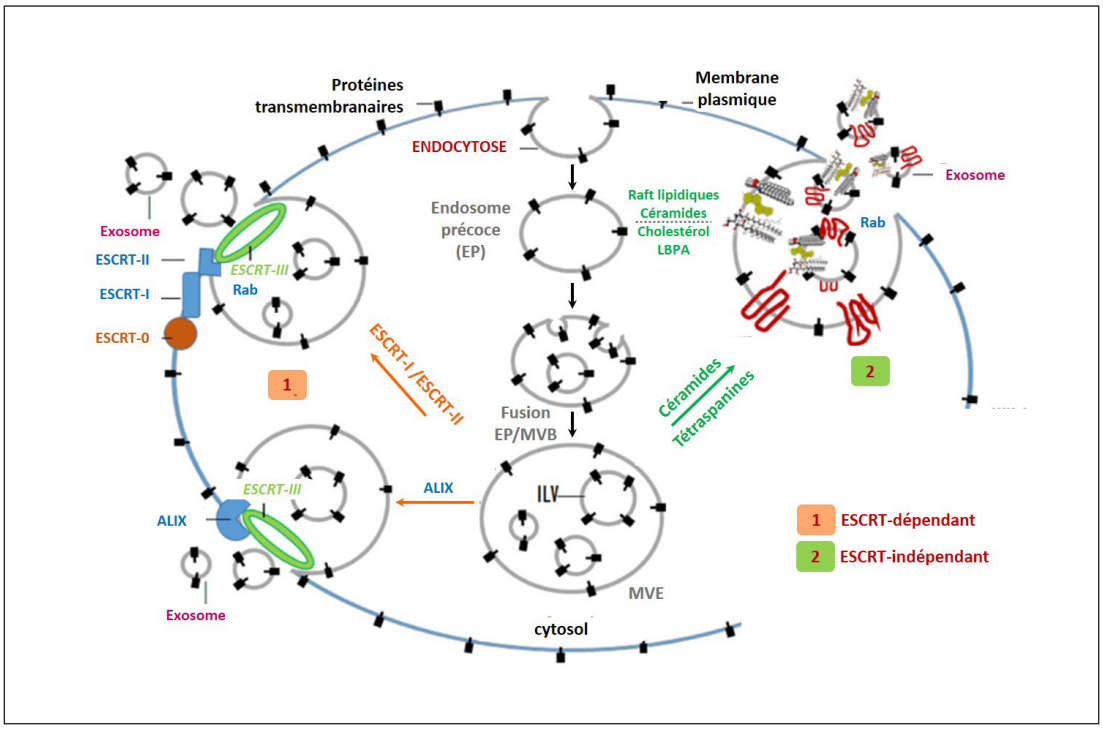


Figure 47. Les voies de biogénèse des exosomes
La voie ESCRT-dépendante (1, orange). La voie ESCRT-indépendante (voie 2, vert).
Adapté de [Kim et al., 2018]

c) Les exosomes

Les exosomes, petites vésicules dont la taille est comprise entre 30 et 100 nm, désignent les VE qui dérivent des vésicules intraluminales (ILV) formées lors de la maturation des endosomes multivésiculaires (MVE, ou corps multivésiculaires) **(Figure 46, Tableau 6)**. Lorsqu'elles sont sécrétées dans le milieu extracellulaire après fusion des MVE avec la membrane plasmique, ces ILV prennent le nom d'exosomes [Van Niel et al., 2018]. Ainsi, plusieurs étapes cellulaires doivent être induites pour permettre la libération des exosomes : la formation de vésicules intraluminales (ILV) dans les MVB, le transport des MVB vers la membrane plasmique et fusion des MVB avec la membrane plasmique. Plusieurs molécules sont impliquées dans la formation des exosomes et dans la sécrétion des protéines qui sont sécrétées par cette voie, cependant il est encore difficile de les distinguer car il n'existe pas de méthodologies efficaces pour les isoler. Les exosomes participent à l'homéostasie cellulaire pour éliminer les composés cellulaires indésirables et toxiques (protéines, lipides et acides nucléiques) [Johnstone et al., 1991; Desdín-Micó and Mittelbrunn, 2017]. Comme ces types de vésicules ne proviennent pas du même compartiment cellulaire, leur composition (lipides / acides nucléiques et protéines) est différente [Durcin et al., 2017 ; Tucher et al., 2018].

La biogénèse des exosomes. L'invagination de la membrane endosomale, générant des ILV dans la lumière des organites, initie la biogénèse des exosomes [Huotari and Helenius, 2011]. La biogenèse se poursuit dans le système endosomal où les endosomes précoces subissent une maturation pour devenir des endosomes tardifs (ou MVE). La formation des ILV requiert la machinerie ESCRT (pour l'anglais « endosomal sorting complex required for transport ») [Van Niel et al., 2018], constituée notamment de 4 complexes protéiques différents (ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT -II, ESCRT –III) et de protéines associées telle que l'ALIX (pour l'anglais « apoptosis-linked gene-2 (ALG2) ») [Henne et al., 2013] **(Figure 47)**. [Colombo et al., 2013] ont montré que cette dernière, lorsqu'elle est inactivée dans les cellules dendritiques, semble modifier la composition en protéines des exosomes, ce qui pourrait indiquer qu'ALIX affecte le choix de molécules de la cargaison et/ou le types de MVB destinés à la sécrétion. Les auteurs ont également montré que l'inactivation d'ALIX, nécessaire à la formation du complexe fonctionnel (ESCRT-II, III, ALIX) [Lata et al., 2009], diminuait la sécrétion d'exosomes. Certaines études suggèrent que la biogenèse du ILV dans les MVE peut se produire par une voie de signalisation indépendante des complexes ESCRT (ou ESCRT-indépendante) [Stuffers et al., 2009b]. Le choix de la voie de signalisation pourrait être spécifique au cargo moléculaire qui doit quitter la cellule [Carayon et

al., 2011], mais ces voies de signalisation ne sont pas encore clairement séparées [Maas et al., 2017]. La voie ESCRT-indépendante ferait intervenir les tétraspanines, des protéines transmembranaires enrichies dans les exosomes [Escola et al., 1998]. Il a été démontré que certaines tétraspanines (CD9, CD63 ou CD82) favoriseraient la libération des exosomes en l'absence des complexes ESCRT [Chairoungdua et al., 2010 ; Hurwitz et al., 2016 ; van Niel et al., 2011]. En plus des protéines, les lipides membranaires seraient également des acteurs essentiels du transport vésiculaire [Stuffers et al., 2009a ; Brügger and Bankaitis, 2012]. Tous deux collaborent étroitement dans les processus essentiels du transport vésiculaire, à savoir la déformation membranaire, la fission et la fusion [McMahon and Boucrot, 2015]. La membrane des MVE est constituée de 4 lipides majoritaires, retrouvés également au sein de la membranes des ILV : la phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P), les céramides (sphingolipides), le cholestérol et l'acide lyso-bis-phophatidique (LBPA) [Henne et al., 2011]. Concentrés en domaines au niveau des radeaux lipidiques de la membrane des MVE, ces lipides sont impliqués dans l'invagination de la membrane des MVE, dans la régulation de la formation des ILV et dans leur devenir [Piper and Katzmann, 2007]. Il a été montré que la courbure de la membrane dépend fortement de la structure et de la nature des lipides membranaires. En effet, [Trajkovic et al., 2008a ; Van Niel et al., 2018 ; Trajkovic et al., 2008b] ont rapporté que les céramides membranaires favoriseraient le bourgeonnement membranaire. Aussi, l'acide LBPA, produite à partir des phospholipides membranaires par la phospholipase D2 (PLD2), favoriserait l'invagination de la membrane en induisant une courbure de la membrane [Kooijman et al., 2003]. Enfin, l'activité de la diacylglycérol kinase-α (DGKα), une enzyme qui ajoute un groupe phosphate au DAG du second messager lipidique et qui génère du PA, semble jouer un rôle négatif dans la formation de MVE, mais elle semble affecter aussi le trafic polarisé des MVB des lymphocytes T [Alonso et al., 2011]. Il a récemment été montré que l'implication de la DGKα dans la maturation des MVE et dans la sécrétion d'exosomes de ces mêmes cellules serait médiée par les protéines kinases-D1 et -D2 [Mazzeo et al., 2016].

Le contenu des exosomes. Les exosomes contiennent différents types de molécules : protéines, lipides et acides nucléiques **(Tableau 6)**. Leur composition dépend en partie du type de cellule mais elle peut également être influencée par les conditions cellulaires et l'état physio-pathologique des individus. De plus, les exosomes libérés par une lignée cellulaire seraient probablement assez hétérogènes [Kowal et al., 2016]. Plusieurs études ont décrit des types de cargaison sécrétés par les exosomes (protéique, lipidique, ARN) ; toutefois, les mécanismes de tri de ces cargaisons ne sont pas encore clairement caractérisés. En ce qui concerne les protéines, il semblerait que les exosomes contiennent des protéines ubiquitinilées [Hessvik et al., 2016 ; Buschow et al., 2005] ; l'ubiquitination pourrait constituer

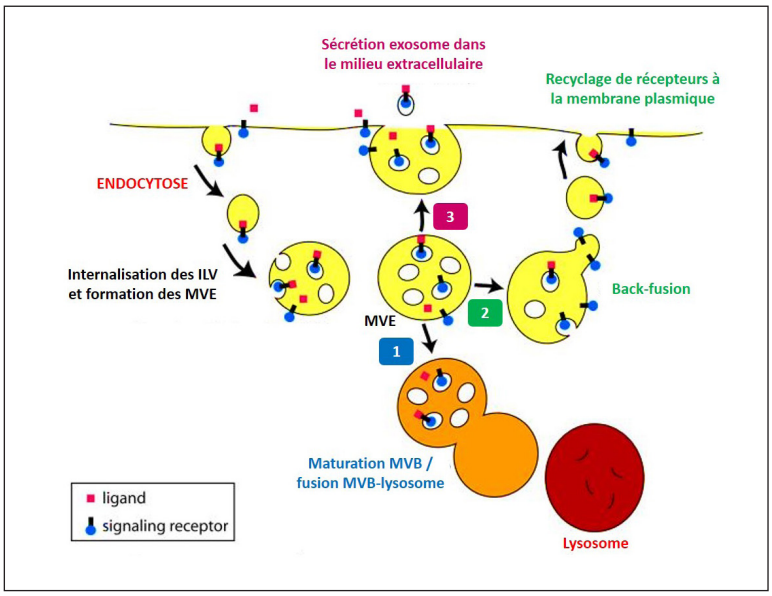


Figure 48. Les trois destinations possibles des vésicules intra-luminales intégrées dans les MVE décrites à ce jour

Les trois voies décrites à ce jour sont la dégradation lysosomale (1, bleu), le stockage temporaire des vésicules intraluminales (ILV) puis back-fusion (2, vert) et la sécrétion d'exosomes (3, fushia). Endosome multivésiculaire (MVE)

Adapté de [Von Bartheld., 2011]

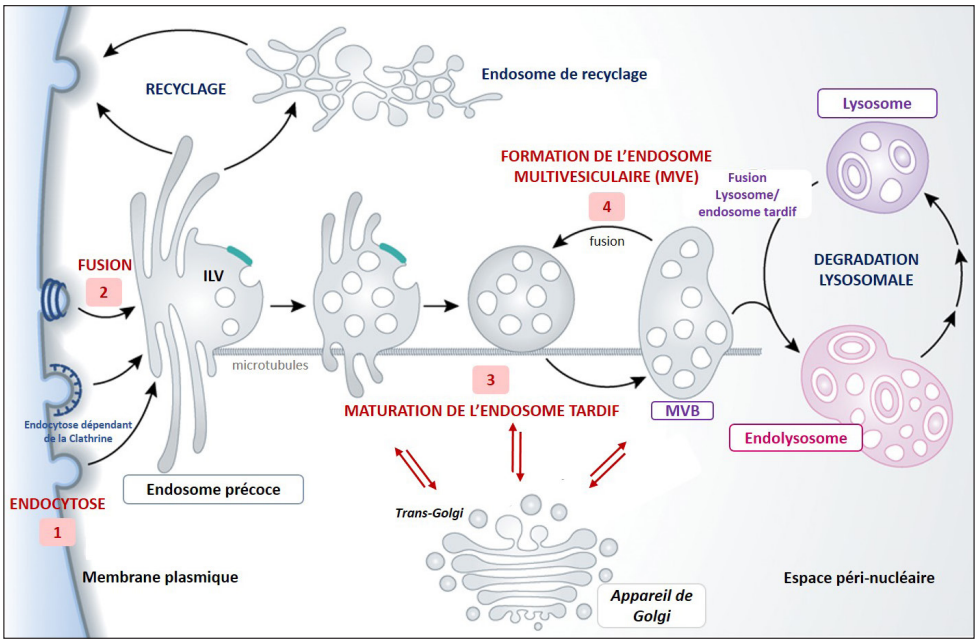


Figure 49. Le système endosome/lysosome

Les vésicules endocytaires livrent leur contenu et leur membrane aux endosomes primaires présents dans le cytoplasme (formation de vésicules intraluminales (ILV)). Au cours de la maturation des endosomes précoces, les VILs s'accumulent au fur et à mesure des cycles de recyclage dans la membrane plasmique (directement ou par le recyclage des endosomes), formant ainsi un endosome tardif. Les endosomes se déplacent vers l'espace péri-nucléaire le long des microtubules. Les endosomes tardifs fusionnent ensuite avec les lysosomes pour former un organite hybride transitoire : l'endolysosome, lieu de dégradation active des contenus vésiculaires. Un autre processus de maturation permet à l'endolysosome d'être converti en un lysosome classique dense, lieu de stockage pour les hydrolases lysosomales et les composants de la membrane.

Adapté de [Huotari and Helenius, 2011]

un mécanisme permettant de cibler les protéines à véhiculer dans les exosomes [Smith et al., 2015 ; Cheng and Schorey, 2016]. Les lipides peuvent également être importants pour trier les protéines à véhiculer dans des exosomes. Des études ont rapporté que les exosomes étaient enrichis en cholestérol, sphingomyéline et glycosphingolipides par rapport à leurs cellules sécrétrices [Skotland et al., 2017]. Ces observations suggèrent que les membranes des exosomes peuvent contenir des radeaux lipidiques, des sous-domaines membranaires enrichis en cholestérol et des glycosphingolipides qui jouent un rôle important dans la signalisation et le tri (ex : la lyn, la flotilline-1 et la stomatine) [De Gassart et al., 2003]. La sphingosine 1-phosphate (SP1), un lipide formé par la phosphorylation de la sphingosine, a aussi été rapportée comme impliquée dans le choix du cargo à véhiculer dans les exosomes. Elle reconnaîtrait des récepteurs spécifiques : les récepteurs S1P couplés à la protéine G inhibitrice (Gi) situés au niveau de la membrane des MVE [Kajimoto et al., 2013]. Ces auteurs ont également montré que l'inactivation de la S1P ne réduisait pas le nombre d'exosomes, ce qui suggère que la S1P est principalement impliquée dans le choix du cargo à véhiculer dans les exosomes et non dans la formation de ILV.

Du transport des MVE à la sécrétion des exosomes. Les MVE peuvent être dirigés vers les lysosomes afin que le contenu des ILV soit dégradé, stockés temporairement, ou alors être transportés vers la membrane plasmique en vue d'être sécrétés sous forme d'exosomes **(Figure 48)** [Huotari and Helenius, 2011 ; Ludwig and Giebel, 2012 ; Raposo and Stoorvogel, 2013]. Cependant, on ne connait encore que très peu les mécanismes moléculaires et statuts cellulaires qui régulent cet équilibre.

• La voie de dégradation par les lysosomes **(Figure 49)** n'est pas encore clairement caractérisée, mais il semblerait les MV enrichies en PI3P et contenant des protéines ubiquitinylées soient destinées à être dégradées par les lysosomes [Villarroya-Beltri et al., 2016], alors que les MV enrichies en acide LBPA échapperaient à la dégradation [Lakkaraju and Rodriguez-Boulan, 2008]. La fusion des MVE avec les lysosomes entraîne la dégradation des protéines et des lipides contenues dans les ILVs par les hydrolases acides retrouvées dans les lysosomes [Bright et al., 2005]. Cependant, trois mécanismes de fusion MVE/lysosomes sont décrits à ce jour **(Figure 50)** : (A) un transport vésiculaire entre l'endosome et le lysosome, sous le contrôle des protéines SNAREs, Rab5 et Rab7 [Hsu et al., 2010], (B) une fusion répétée par l'intermédiaire de pores transitoires entre les 2 organelles (ou « Kiss and run ») et (C) une fusion conduisant à la formation d'un compartiment hybride (endolysosome), suivie d'une fission pour reformer des lysosomes « natifs » [Bright et al., 2005].

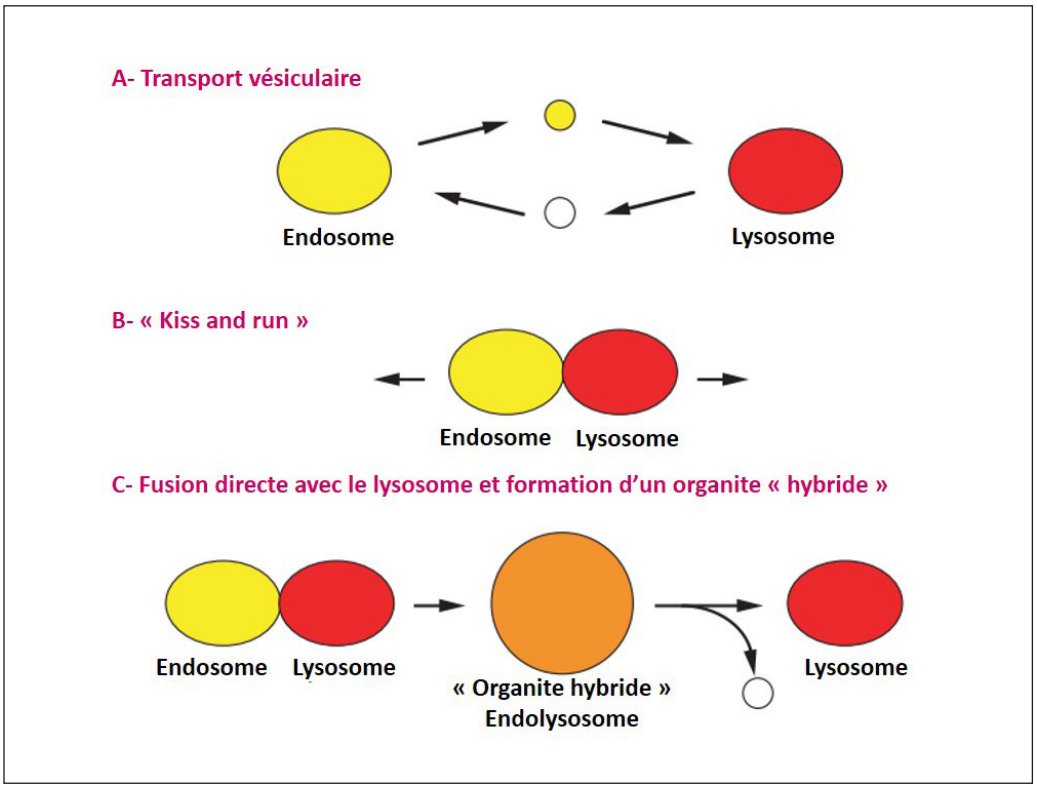


Figure 50. Les mécanismes de dégradation du contenu des ILV par les lysosomes
(A) Le transport vésiculaire est le système modèle utilisé par les protéines vSNAREs et autres protéines endosomales après la fusion des vésicules avec les lysosomes. (B) Le mécanisme « Kiss and run » où des pores de fusion transitoires sont formés entre endosome tardif et lysosome. (C) La fusion directe entre endosome tardif et lysosome génère un organite hybride transitoire (Endolysosome), qui reformera par la suite un lysosome classique. Ce mécanisme nécessite une re-condensation de contenu hybride ainsi que le recyclage de v-SNAREs et autres protéines endosomales, probablement via le transport vésiculaire (A).
Adapté de [Luzio et al., 2000]

• Les MVE peuvent également jouer un rôle de stockage pour les molécules internalisées **(Figure 48)**. Ce système est notamment utilisé dans les cellules dendritiques avec le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH-II) complexé aux peptides antigéniques. Une fusion de type « back-fusion » est réalisée entre les ILV enrichies en complexes CMH-II/peptides antigéniques et la membrane endosomale. Cette fusion permet un enrichissement de ce complexe immunogénique au niveau de la membrane endosomale qui va émettre des bourgeonnements externes conduisant à la formation de vésicules. Ces dernières pourront ensuite fusionner avec la membrane plasmique pour permettant ainsi la présentation de l'antigène par les molécules de classe II, à la surface de la cellule **(Figure 48)** [van der Goot and Gruenberg, 2006 ; Von Bartheld and Altick, 2011].

• Le transport des MVE vers la membrane plasmique, et donc la libération des ILV sous forme d'exosome, dépend de l'interaction des MVE avec l'actine et le cytosquelette microtubulaire [Villarroya-Beltri et al., 2014 ; Hoshino et al., 2013] **(Figure 48)**. Des auteurs ont rapporté la cortactine, une protéine liant l'actine, comme positivement associée à la libération d'exosomes. Cette dernière serait à la fois impliquée dans le trafic et dans l'amarrage des MVE à la membrane plasmique [Sinha et al., 2016]. Les protéines Rab, appartenant à la famille de petites GTPases [Stenmark, 2009], seraient également impliquées dans la régulation de nombreuses étapes du trafic des MVE, notamment le bourgeonnement de la membrane, le transport des vésicules le long de l'actine et de la tubuline, ainsi que la fusion membranaire. Bien que leur mécanisme d'action précis dans ce processus ne soit pas encore clairement connu, plusieurs protéines Rab ont également été rapportées comme impliquées dans la sécrétion d'exosomes. Il semblerait que les protéines Rab27a et Rab27b soient impliquées dans la fusion des MVE avec la membrane plasmique [Ostrowski et al., 2010]. La protéine Rab27a permettrait également de faire le lien entre les MVE et les moteurs moléculaires nécessaires au déplacement des MVE le long des filaments d'actine. L'absence de la protéine Rab27a conduit à une augmentation de la taille des MVE, due à une accumulation des ILV non libérées. La protéine Rab27b permet le transfert des MVE situés au niveau des microtubules aux filaments d'actine, qui vont permettre sa localisation au niveau de la membrane plasmique. L'absence de la protéine Rab27b entraîne une localisation périnucléaire des MVE, empêchant ainsi sa fusion à la membrane plasmique [Ostrowski et al., 2010]. Les protéines Rab11 et Rab35 semblent également intervenir dans l'interaction entre les membranes des MVE et la membrane plasmique, en permettant l'accrochage et la fusion des MVE à la membrane plasmique en présence de calcium et à un pH donné [Savina et al., 2005 ; Fader et al., 2005 ; Hsu et al., 2010]. La perte fonctionnelle de ces deux protéines entraîne une accumulation des ILV dans les MVE, due à l'absence de fusion des

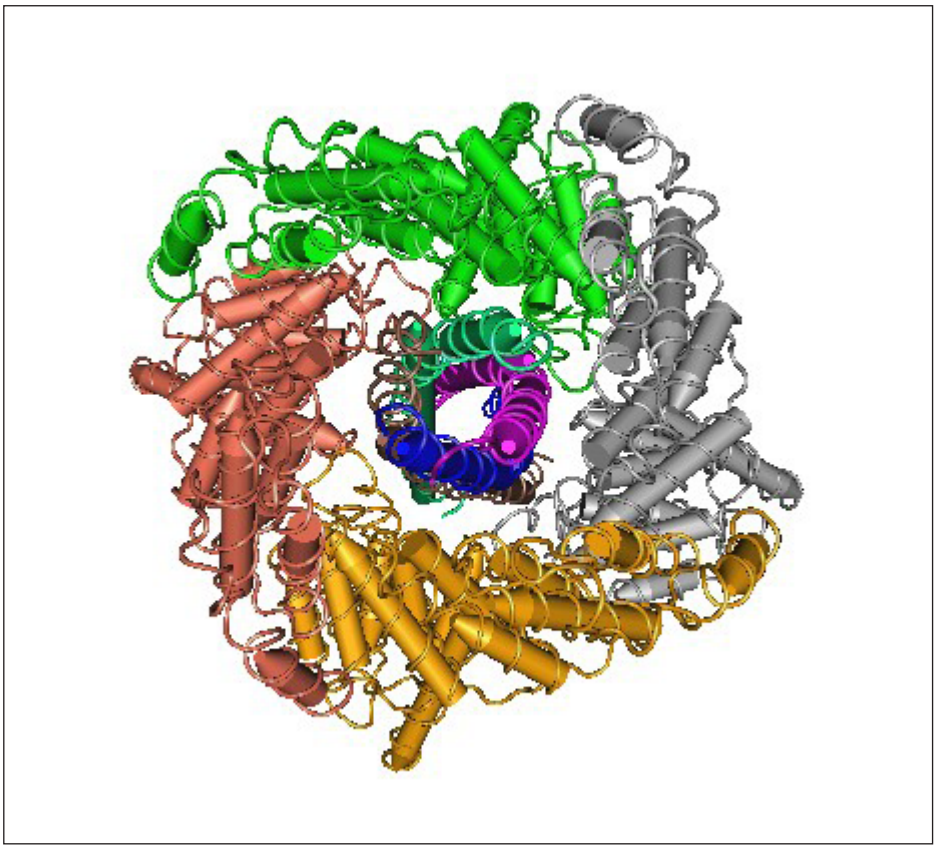


Figure 51. Structure cristallographique d'un complexe SNARE de *Bos taurus*
Source : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Localisation de la zone de l'IGP Fleur d'Aubrac, des différentes exploitations enquêtées et de l'abattoir

MVE avec la membrane plasmique [Hsu et al., 2010 ; Hu et al., 2012]. La protéine Rab 27 interviendrait plutôt dans l'adressage à la membrane cellulaire des endosomes tardifs vers les lysosomes [Blanc and Vidal, 2018].

Les exosomes sont libérés dans le milieu extracellulaire lors de la fusion des MVB avec la membrane plasmique. Au cours de ce processus, un certain nombre d'interactions protéines/protéines et lipides/protéines facilitent la fusion, tout en apportant une spécificité. La machinerie moléculaire spécifique pour la fusion de MVB avec la membrane plasmique n'est pas encore très bien caractérisée. Cependant, ce phénomène de fusion membranaire impliquerait notamment les protéines SNAREs, les protéines Rabs et autres protéines Ras GTPases [Pfeffer, 2007]. Les protéines SNAREs facilitent la fusion des vésicules avec leur membrane cible, telles que la membrane plasmique ou la membrane de différents organites [Bonifacino and Glick, 2004]. Un complexe SNARE est constitué de trois ou quatre protéines SNARE formant quatre hélices en spirale **(Figure 51)**. Aussi, d'autres auteurs ont rapporté l'importance de certaines protéines (ex : VAMP7), associées au complexe SNARE, dans la fusion des MVE avec la membrane plasmique [Fader et al., 2009].

Enfin, il a été montré que la libération d'exosomes pouvait être régulée par le Ca^{2+} et par le pH. Le Ca^{2+} intracellulaire est impliqué, de manière générale, dans tous les mécanismes de fusion membranaires de la voie endosomale et notamment dans la sécrétion des exosomes [Savina et al., 2003 ; Carafoli, 2002]. Des études basées sur l'utilisation d'ionophores et/ou de chélateurs calciques sur des cellules K562 de l'érythroleucémie humaine ont rapporté que l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire augmente la sécrétion d'exosomes, ce qui confirment l'impact du calcium sur la sécrétion des exosomes [Savina et al., 2003]. Certaines protéines, telles que les synaptotagmines, qui fonctionnent comme des capteurs de calcium, ont été rapportées comme impliquées dans le transport vésiculaire [Tucker and Chapman, 2002], en réduisant la sécrétion d'exosomes probablement en affectant la fusion des MVB avec la membrane plasmique [Hoshino et al., 2013]. Aussi, d'autres protéines telles que les annexines seraient impliquées dans la biogénèse et la fusion des MVE avec la membrane plasmique. Les annexines sont des protéines solubles capables de lier les lipides membranaires, tels que la phosphatidylsérine, la phosphatidylcholine et le phosphatidylinositol, en présence de calcium. L'annexine-2 a notamment été rapportée comme impliquée dans les processus d'endocytose et d'interactions de la membrane des endosomes au cytosquelette (microtubules et filaments d'actine) [Chasserot-Golaz et al., 2005]. Les annexines-1, -2 et -6 sont présentes dans les différents compartiments endosomaux. L'annexine-1 et -2, toutes deux

retrouvées au niveau de la membrane plasmique et de la membrane des endosomes, sont impliquées dans la formation des ILV (annexine-1) ou dans la maturation des endosomes et dans la localisation des MVE à la membrane plasmique (annexine-2) [Gerke et al., 2005 ; Futter and White, 2007]. L'annexine-6, retrouvée au niveau de la membrane des endosomes tardifs, permet quant à elle la co-localisation et la fusion des MVE aux lysosomes [Valapala and Vishwanatha, 2011 ; Gerke and Moss, 2002 ; Futter and White, 2007]. Le pH régule également la libération des exosomes. En effet, au niveau des masses tumorales, où l'environnement extracellulaire est acide, une libération accrue d'exosomes est observée. Cet environnement acide semblerait également favoriser la capture des exosomes par les cellules [Parolini et al., 2009 ; Kharaziha et al., 2012].

4. Les VEs et le muscle strié squelettique

Le muscle squelettique est capable de s'adapter pour répondre aux conditions environnementales (ex : activité physique, sédentarité) et aux contraintes physiologiques (ex : nutrition, inflammation chronique,…) en modifiant la taille et la composition de ses fibres. Ces modifications associées à la sécrétion de myokines dans le milieu extracellulaire qui sont capables de moduler l'homéostasie des organes périphériques tels que le pancréas, le foie, l'os ou le tissu adipeux [Plomgaard et al., 2012 ; Leal et al., 2018 ; Guo et al., 2017 ; Lee and Jun, 2019], ou la myogenèse [Henriksen et al., 2012]. Au cours de la dernière décennie, il a été montré que les cellules musculaires sont capables de libérer des VEs dans le milieu extracellulaire. Ces observations suggèrent que le muscle utilise des signaux paracrine et endocrine mais aussi les VEs pour communiquer avec les autres organes et/ou tissus [Guescini et al., 2010 ; Le Bihan et al., 2012 ; Romancino et al., 2013 ; Forterre et al., 2014].

À retenir…

• *L'émergence des nouvelles technologies ont fait exploser les volumes de données. Beaucoup de données restent inexploitées.*

• *Le partage et la réutilisation des données s'inscrit dans une démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale.*

• *La réutilisation et le traitement de données omiques agrégées peuvent être réalisés selon deux stratégies : « la revue systématique de la littérature » (approche qualitative) et la « méta-analyse (quantitative). Ces deux stratégies doivent répondre à une méthodologie particulière.*

•*L'agrégation des données publiques pourrait permettre de reconstruire le sécrétome musculaire et ainsi de proposer des candidats plasmatiques pour évaluer ou prédire plus précocement et de façon moins invasive la qualité de la viande.*

• *Plusieurs voies de sécrétion sont décrites dans la littérature : (i) les voies « conventionnelles », et (ii) les voies non-conventionnelles (ou UPS). Ces dernières peuvent être vésiculaires ou non-vésiculaires. D'autres voies décrites plus récemment (micro- (MVs) et nano-vésiculaires (exosomes)) sont impliquées dans le transport de molécules et dans la communication tissulaire.*

• *L'étude des voies de sécrétion protéiques pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent le déterminisme de la tendreté.*

Objectifs de la Thèse

Objectifs de la Thèse

Les consommateurs de viande bovine recherchent une régularité de la qualité de la viande dans la limite d'un bon rapport qualité/prix et restent particulièrement attachés à un approvisionnement régional. Ainsi une viande régulière, voire supérieure, serait une plus-value pour les systèmes d'élevage en zone de montagne par rapport aux produits issus d'élevages intensifs ou de l'exportation. Cependant, la variabilité élevée des qualités sensorielles de la viande bovine, et particulièrement la tendreté, ne permet pas aujourd'hui de garantir un produit de qualité régulière. C'est pourquoi l'ensemble de la filière viande bovine (éleveurs, sélectionneurs, industriels) est en attente d'outils pour évaluer le « potentiel qualité » des bovins de leur vivant ou sur les carcasses à l'abattoir.

Dans ce contexte, le projet « Ressourcement S3 » dans lequel s'inscrit mon travail de thèse, en collaboration avec un projet en cours dans l'équipe avec la filière Indication Géographique Protégée (IGP) « Génisse Fleur d'Aubrac » (financement FEDER-Région Auvergne-Rhône-Alpes), a été construit dans le but d'identifier de nouveaux biomarqueurs innovants pour permettre de prédire la qualité des viandes de l'élevage bovin de demain, et notamment de valoriser des filières de qualité d'élevage de montagne dans la région du Massif-Central.

L'originalité de ma thèse réside tout d'abord dans son enjeu. Il s'agit de contribuer à identifier des biomarqueurs protéiques dans le plasma pour, à terme, proposer des outils de phénotypage moins-invasifs que les méthodes d'évaluation développées actuellement au niveau musculaire. Ces biomarqueurs peu-invasifs auront également pour avantage de prédire plus précocement, en amont de l'abattage et de la commercialisation, la qualité de la viande bovine (et notamment la tendreté).

Le bilan des connaissances bibliographiques présenté dans les chapitres précédents, a révélé des mécanismes très complexes, non encore tous élucidés, pour expliquer le déterminisme de la tendreté. De plus, la découverte de biomarqueurs musculaires présente des limites pour des applications futures. En effet, en plus d'être invasifs pour les animaux, les prélèvements par biopsie musculaire déprécient les carcasses engageant des pertes économiques pour les industriels. De plus, certains biomarqueurs étant inversement corrélés avec la tendreté selon le type de muscle, l'utilisation de biomarqueurs musculaires ne permet pas aujourd'hui de prédire le « potentiel » tendreté d'un animal ou d'une carcasse mais seulement la tendreté pour un muscle donné. L'ensemble de ces éléments nous a conduits à émettre les

hypothèses suivantes : (i) le muscle étant un tissu sécréteur, le plasma pourrait être une source de biomarqueurs « génériques », pour prédire le potentiel de tendreté du vivant de l'animal. Aussi, (ii) une approche innovante d'intégration de données publiées combinées à la bio-informatique (analyse *in-silico*) pourrait permettre d'identifier de potentiels candidats plasmatiques à partir d'une agrégation des données « omiques » en lien avec la tendreté de la viande bovine.

Dans ce contexte, l'objectif scientifique de ma thèse est d'identifier, par une approche *in-silico* et expérimentale, des biomarqueurs plasmatiques pour prédire la tendreté de la viande bovine. Ces deux approches permettront de proposer pour la première fois une liste de candidats plasmatiques associés à la tendreté de la viande. Ces biomarqueurs plasmatiques, moins invasifs que ceux actuellement mesurés à partir d'échantillons musculaires, seraient compatibles avec une future application de « terrain ». Ainsi, ils pourraient permettre de prédire la tendreté de la viande plus précocement. L'approche expérimentale vise à compléter la liste de candidats musculaires actuellement disponibles en proposant une liste de nouveaux candidats musculaires associés à la tendreté de la viande bovine. Enfin, menée pour la première fois sur des génisses, cette approche expérimentale permettra de comparer les mécanismes impliqués dans le déterminisme de la tendreté entre des mâles (majoritairement rapportés dans la littérature) et des génisses pour identifier d'éventuelles spécificités ou voies biologiques communes entre ces types d'individus.

La démarche retenue pour atteindre ces objectifs consiste à :

1- Exploiter et intégrer l'ensemble des données de polymorphisme génétique, de protéomique et de transcriptomique de muscle, issues de diverses expérimentations conduites à l'INRA et dans d'autres groupes internationaux pour construire un méta-jeu de données « omiques » lié à la tendreté de la viande bovine.

2- Analyser ce méta-jeu de données pour identifier *in-silico* des protéines candidates plasmatiques, potentiellement sécrétées par le tissu musculaire, mais également par d'autres tissus et/organes. Cette analyse permettra également de caractériser la(les) spécificité(s) des protéines prédites comme sécrétées, par des voies de sécrétions conventionnelles et non-conventionnelles (UPS) de sécrétion, en mettant en lumière des mécanismes de sécrétion qui pourraient expliquer une part des mécanismes impliquées dans la tendreté *(Publication 1 et Publication 2 (Data Paper))*.

3- Conduire une analyse protéomique entre des groupes contrastés pour la tendreté pour identifier des protéines différentiellement abondantes dans le tissu musculaire et/ou dans le plasma.

4- Analyser statistiquement ces protéomes différentiels pour identifier les candidats musculaires et plasmatiques les plus robustes. Cette analyse permettra d'une part de proposer, pour la première fois, une liste de biomarqueurs musculaires reliés à la tendreté de génisses et d'autre part de proposer, pour la première fois, une liste de biomarqueurs plasmatiques.

5- Analyser les signatures musculaires et plasmatiques pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents qui pourraient permettre de mieux comprendre les mécanismes liés au déterminisme de la tendreté (analyse bio-informatique). *L'ensemble des points 3-, 4- et 5- font l'objet de la Publication 3*.

L'ensemble des données obtenues par les deux approches permettront de proposer une liste de nouveaux candidats musculaires et plasmatiques. Ces derniers permettront, à terme, de mettre en place un nouveau type de management de la qualité et des modes de production de viande. L'intégration de l'ensemble des données acquises par l'analyse bio-informatique permettra de mieux comprendre les mécanismes biologiques ainsi que les voies de sécrétions particulières qui sont impliqués dans le déterminisme de la tendreté. L'ensemble de ces connaissances permettra, à terme, de développer des outils de prédiction pour la filière, en particulier pour du phénotypage moléculaire *(Discussion générale)*.

Résultats

Publication 1

Aggregation of omic data and secretome prediction enable the discovery of candidate plasma biomarkers for beef tenderness

Sabrina Boudon, Joëlle Henry-Berger et Isabelle Cassar-Malek

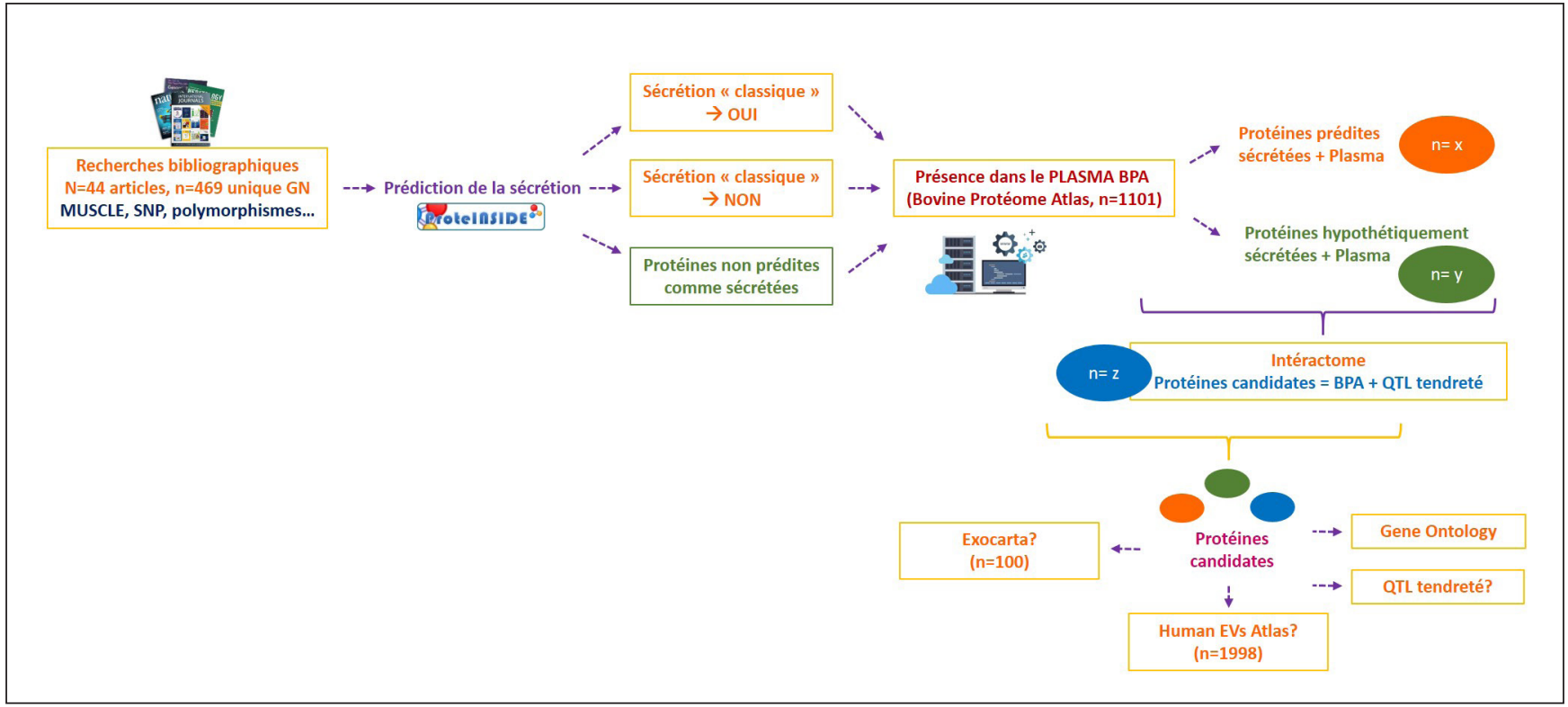
« International Journal of Molecular Sciences », Publiée le19 Janvier 2020

[Boudon et al., 2020], DOI : 10.3390/ijms21020664

Introduction à la publication 1

Les produits animaux sont la principale source de protéines et de nutriments essentiels dans l'alimentation humaine [Salter, 2013 ; Tinggi, 2008]. Un des défis du secteur bovin dans les pays industrialisés consiste à prédire et piloter les qualités organoleptiques de la viande afin d'assurer une moindre variabilité pour satisfaire la demande des consommateurs. Parmi les qualités sensorielles de la viande (tendreté, jutosité, flaveur et couleur), la tendreté, qualité la plus recherchée par les consommateurs, reste une priorité pour le secteur [O'Quinn et al., 2018]. Toutefois, la tendreté de la viande bovine est un phénotype complexe qui présente une très grande variabilité inter- et intra-individuelle et peut être influencée par de nombreux facteurs (génotype, race, âge, sexe, conditions d'élevage, d'abattage et les facteurs technologiques *post-abattage*…) [Picard and Kondjoyan, 2019].

Actuellement les qualités sensorielles de la viande ne peuvent être évaluées qu'après maturation de cette dernière. Cette évaluation tardive limite l'approvisionnement de viande de qualité régulière. L'identification de biomarqueurs pour la qualité de la viande, mesurable chez les animaux vivants serait une avancée importante car elle permettrait d'élaborer des outils d'évaluation, d'aide à la décision pour le pilotage de la qualité de la viande. Grâce à la génomique, plusieurs groupes de recherche ont identifié de potentiel biomarqueurs de qualité à partir d'échantillons musculaires. Cette approche a aussi permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à la tendreté de la viande bovine, pour mieux la prédire [Picard et al., 2017]. Certains polymorphismes génétiques, expressions différentielles de transcrits et abondances différentielles de protéines d'origine musculaire ont été reliés à la tendreté de la viande bovine [Picard et al., 2015a]. Certains marqueurs génétiques ont même été commercialisés dans des tests génétiques. Des études protéomiques ont confirmé l'importance de certaines voies biologiques dans le déterminisme de la tendreté de la viande bovine [De Almeida et al., 2017 ; D'Alessandro and Zolla, 2013a]. Ainsi des protéines impliquées dans la structure musculaire, le métabolisme énergétique, la protéolyse ou l'apoptose ont été rapportés dans la littérature (voir revue, [Picard and Gagaoua, 2017b]. Cependant, des études ont révélé une forte variabilité des biomarqueurs musculaires selon les races, les individus et les muscles étudiés [Bouley et al., 2004 ; Picard et al., 2014 ; Gagaoua et al., 2016]. De plus, des relations inverses entre certains biomarqueurs et la tendreté ont également été rapportées comme associées aux propriétés musculaires et au potentiel des animaux [Picard et al., 2014]. De plus, jusqu'à aujourd'hui, les recherches de biomarqueurs de la qualité de viande nécessitent le prélèvement


Recherches bibliographiques
N=44 articles, n=469 unique GN
MUSCLE, SNP, polymorphismes…
Prédiction de la sécrétion
ProteINSIDE
Sécrétion « classique »
→ OUI
Sécrétion « classique »
→ NON
Protéines non prédites
comme sécrétées
Présence dans le PLASMA BPA
(Bovine Protéome Atlas, n=1101)
Protéines prédites
sécrétées + Plasma
n= x
Protéines hypothétiquement
sécrétées + Plasma
n= y
n= z
Intéractome
Protéines candidates = BPA + QTL tendreté
Protéines
candidates
Exocarta?
(n=100)
Gene Ontology
QTL tendreté?
Human EVs Atlas?
(n=1998)

d'échantillons musculaires sur des animaux abattus, ou la réalisation de biopsies sur animaux vivants. L'identification de biomarqueurs génériques et peu-invasifs dans les fluides biologiques serait une opportunité de phénotypage moléculaire chez les animaux vivants [Cassar-Malek and Picard, 2016]. Comme les protéines circulantes reflètent la physiologie de l'individu, la découverte de biomarqueurs plasmatiques pourrait permettre de prédire le potentiel de tendreté dès le vivant des animaux.

Cette étude avait pour objectif d'identifier, à partir de données disponibles dans la littérature, de potentiels biomarqueurs peu-invasifs qui pourraient être retrouvés dans le plasma. L'approche retenue a consisté à agréger des données moléculaires de la littérature (origine protéomique, transcriptomique, SNP et polymorphismes génétiques) en lien avec la tendreté de la viande bovine. Un jeu de données agrégées a été constitué et analysé par bio-informatique pour prédire un « sécrétome » en lien avec la tendreté selon la démarche analytique présentée ci-après. Les voies biologiques (étude de la Gene Ontology) et les Quantitatives trait Loci (QTL) de tendreté associée aux protéines candidates ont été recherchés. Une étude complémentaire des voies de sécrétion de type vésiculaire a également été conduite (Exocarta et Human EVs Atlas).

Démarche analytique / Workflow

La démarche analytique comprend plusieurs étapes **(voir Workflow ci-contre)** :

1- **Recherche bibliographique.** Une fois les objectifs de recherche définis, la recherche et la sélection des articles à intégrer dans la base de données a été réalisée. Une liste de mots clés validés par plusieurs personnes (experts du sujet) a été utilisée pour cela.

2- **Conception de la base de données (revue systématique de la littérature)**. La conception et la catégorisation du type de données à intégrer dans la base de données sont étroitement liées aux objectifs de recherche que nous avons définis et décrits précédemment. Nous avons choisi de conserver les champs suivants : l'ID protéiques (Gene Name), la race, l'espèce, le sexe, l'âge à l'abattage, le type de muscle, le sens de la relation à la tendreté rapporté par les études, la méthodologie utilisée et le pays où ont été réalisés les travaux, le type d'évaluation de la tendreté, ainsi que la référence de l'article et les auteurs de ce dernier. Pour simplifier l'utilisation de la base de données, ces champs ont été décomposés au maximum afin de pouvoir par la suite filtrer et catégoriser les données en fonction des informations

ciblées par l'utilisateur de la base de données. L'ensemble de ces données a été structuré sous la forme d'une feuille de calcul Excel. Ainsi, les données apparentées sont regroupées dans des « tables », regroupées selon les lignes et les colonnes de la feuille de calcul. Chaque ligne d'une table est appelée « enregistrement ». Les enregistrements contiennent les données relatives à une étude pour un ID Gene Name donné. Chaque colonne d'une table est appelée « champ » ou « attribut ». Les champs contiennent un seul type d'information qui apparaît dans chaque enregistrement. Enfin, il faut déterminer les paramètres des champs. Ce sont des « mots clés » qui doivent être uniques et immuables. Il ne doit jamais y avoir de paramètre de champs vides. Une fois les données converties en tables, il est possible de visualiser facilement le(s) relation(s) entre les données au travers d'un filtrage des champs. [Lucidchart. Lucid Software Inc.]

3- **L'analyse bio-informatique des données agrégées.** Cette étape m'a permis de proposer une liste de protéines plasmatiques candidates pour prédire la tendreté de la viande bovine. L'analyse intégrative de ma base de données a été réalisée à l'aide de différents outils de bio-informatique :

• Différents softwares de ProteINSIDE (http://www.proteinside.org/), un outil « free web service », développé par l'équipe dans laquelle j'ai réalisé ma thèse : (i) le software « Peptide Prediction » qui permet d'identifier les protéines sécrétées, non-sécrétées ou peptides transmembranaires (Présence d'une séquence Signal-P et/ou d'un domaine transmembranaire). Cet outil m'a ainsi permis de prédire le « sécrétome » associé à la tendreté de la viande, en vérifiant au sein de ma base de données si les protéines annotées par la Gene Ontology ont une fonction sécrétoire ; (ii) le software « ontologies » m'a permis d'identifier les termes GO les plus pertinents et spécifiques des différentes listes de protéines générées à partir de la base de données ; (iii) le module « ProteoQTL » associé à ProteINSIDE (spécifique bovin) m'a permis d'identifier les protéines candidates d'intérêt incluses dans des QTL associés au caractère tendreté.

• Revigo (http://revigo.irb.hr/), un outil « Web server » qui permet de regrouper sémantiquement les termes GO afin de supprimer les termes redondants m'a permis de générer des tables de Gene Ontology synthétiques pour visualiser et comparer plus aisément les GO termes associés aux différentes listes d'intérêt générées à partir de la base de données.

• Reactome (https://reactome.org/), un outil « free web service", basé sur l'utilisation d'une base de données répertoriant des voies biologiques organisées et évaluées manuellement par des pairs m'a

permis de générer une représentation hiérarchique des voies biologiques associées aux différentes listes d'intérêt générées à partir de la base de données.

• Cytoscape (https://cytoscape.org/), une plateforme software open source, m'a permis de générer l'interactome des candidats proposés par ces travaux de thèse.

4- **La bio-analyse des données.** La comparaison de ma base de données avec des atlas (i) de protéines vésiculaires (Human « micro-vésicular » Proteome Atlas (HPA, https://www.proteinatlas.org/) et (ii) de protéines macro-vésiculaires (ou exosomes) Atlas (Exocarta, http://www.exocarta.org/), tous deux accessibles sur des bases de données publiques, m'a permis de proposer les voies de sécrétion vésiculaires comme potentiellement associées avec un certain nombre de protéines candidates identifiées et ainsi avec la tendreté de la viande bovine.

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

Aggregation of Omic Data and Secretome Prediction Enable the Discovery of Candidate Plasma Biomarkers for Beef Tenderness

Sabrina Boudon [1], Joelle Henry-Berger [2] and Isabelle Cassar-Malek [1,*]

[1] Université Clermont Auvergne, INRAE, VetAgro Sup, UMR Herbivores, F-63122 Saint-Genes-Champanelle, France; sabrina.boudon@inra.fr
[2] Université Clermont Auvergne, GReD, UMR CNRS 6293–Inserm U1103, 63001 Clermont-Ferrand, France; joelle.henry@uca.fr
* Correspondence: isabelle.cassar-malek@inra.fr; Tel.: +33-7362-4657

Received: 19 December 2019; Accepted: 16 January 2020; Published: 19 January 2020

Abstract: Beef quality is a complex phenotype that can be evaluated only after animal slaughtering. Previous research has investigated the potential of genetic markers or muscle-derived proteins to assess beef tenderness. Thus, the use of low-invasive biomarkers in living animals is an issue for the beef sector. We hypothesized that publicly available data may help us discovering candidate plasma biomarkers. Thanks to a review of the literature, we built a corpus of articles on beef tenderness. Following data collection, aggregation, and computational reconstruction of the muscle secretome, the putative plasma proteins were searched by comparison with a bovine plasma proteome atlas and submitted to mining of biological information. Of the 44 publications included in the study, 469 unique gene names were extracted for aggregation. Seventy-one proteins putatively released in the plasma were revealed. Among them 13 proteins were predicted to be secreted in plasma, 44 proteins as hypothetically secreted in plasma, and 14 additional candidate proteins were detected thanks to network analysis. Among these 71 proteins, 24 were included in tenderness quantitative trait loci. The in-silico workflow enabled the discovery of candidate plasma biomarkers for beef tenderness from reconstruction of the secretome, to be examined in the cattle plasma proteome.

Keywords: data aggregation; secretome; plasma proteome; biomarkers; meat tenderness

1. Introduction

Animal products are the main source of protein and essential nutrients in human nutrition. While in developing countries, the objective is to increase meat production to meet human nutritional needs, in industrialised countries the major expectations concern meat quality [1] A challenge for the beef sector in those countries is to predict and manage the meat quality attributes in order to ensure their low variability. Among the attributes of beef eating quality (tenderness, juiciness, flavour and colour), tenderness is a top priority for the beef industry to meet consumers' expectations [2] However, beef tenderness is a complex phenotype with large individual variation within and between animals that can vary according to multi-factorial influences. Factors related to the animal itself including genotype [3] and physiological type (breed, age, and sex) [4–6] contribute to the variability in tenderness. Extrinsic factors include management systems and rearing conditions [7–9], animal transport and handling during the pre-slaughtering period, slaughtering conditions [10], and post-slaughter factors including maturation, storage and cooking [4,11].

Today, meat tenderness attributes are assessed only after animal slaughtering and meat ageing which limits the delivery of consistent quality meat [12–14]. Thus, the identification of biomarkers for meat quality measurable in living animals is a good opportunity to develop monitoring, decision-making

and management tools for beef quality prior to slaughter. Thanks to genomics, several research groups have investigated the potential of muscle-derived markers for characterizing the molecular mechanisms underlying beef tenderness as well as for prediction purpose. Some DNA polymorphisms and transcript abundances were related to variation in tenderness. Thus, markers linked to genetic polymorphism were identified in proteolytic genes e.g., *CAPN1, CAST* [15,16] and marketed as genetic tests. Transcriptional muscle profiling enabled the detection of gene transcripts involved in fat, energy metabolism and heat shock response (e.g., *DNAJA1, HSPB1* and *CRYAB*), as candidate biomarkers for meat tenderness [17,18], which were included in a dedicated micro-array [18]. The development of proteomics has taken the issue of identification of tenderness biomarkers a step further [19,20]. Proteomic studies confirmed the importance for meat tenderness of proteins involved in muscle structure, energy metabolism, proteolysis or apoptosis (for a review, Picard et al. [21]). However, a high variability in muscle biomarker content is detected among breeds, individuals and muscles [22]. In addition, inverse relationships between some biomarkers and beef tenderness were also reported as a function of muscle properties [23].

So far, biomarker assessment requires muscle sampling in slaughtered animals or biopsies on living animals. Thus, the identification of generic and low invasive biomarkers in body fluids is an issue for molecular phenotyping in living animals [24]. As circulating proteins mirror the individual's physiology, identification of plasma biomarkers could allow prediction of the tenderness potential of living animals. In this study, we hypothesized that the aggregation of public data may help to identify candidate plasma biomarkers for beef tenderness from the secretome of muscle. We thus designed a workflow to generate a dataset of known biomarkers for tenderness and predict in silico the proteins secreted through conventional pathways or other pathways allowing transit of proteins from muscle to the plasma.

2. Results

2.1. Literature Search and Data Aggregation

A total of 459 articles including one GSE were identified using the MEDLINE, GOOGLE and CLAVIRATE analytics as related to meat tenderness (Figure 1). Among them, 425 articles were excluded because they did not meet the criteria of inclusion. From the corpus of the 44 remaining publications, 26 articles were identified as eligible for proteomic data [17,23–47]. Eleven articles including the series accession number GSE9256 (PMID: 18443416) were found as eligible for transcriptomic data [15,17,18,24,41,48–53]. Twelve articles were found as eligible for genetic data [18,50,54–63]. The computational data aggregation from these 44 publications gave an overview of 1299 ID gene name (GN) related to meat tenderness whatever the muscle, breed, animal type, sex, age at slaughter, geographic area, and methodologies used for tenderness evaluation. Depending on the type of molecule studied (protein, transcript or gene): 139 unique GN were reported as proteomic data, 249 unique GN as transcriptomic data, and 123 unique GN as genetic data. The compilation of these three lists generated the aggregated dataset comprising 469 non-redundant GN (Table 1, Figure 2).

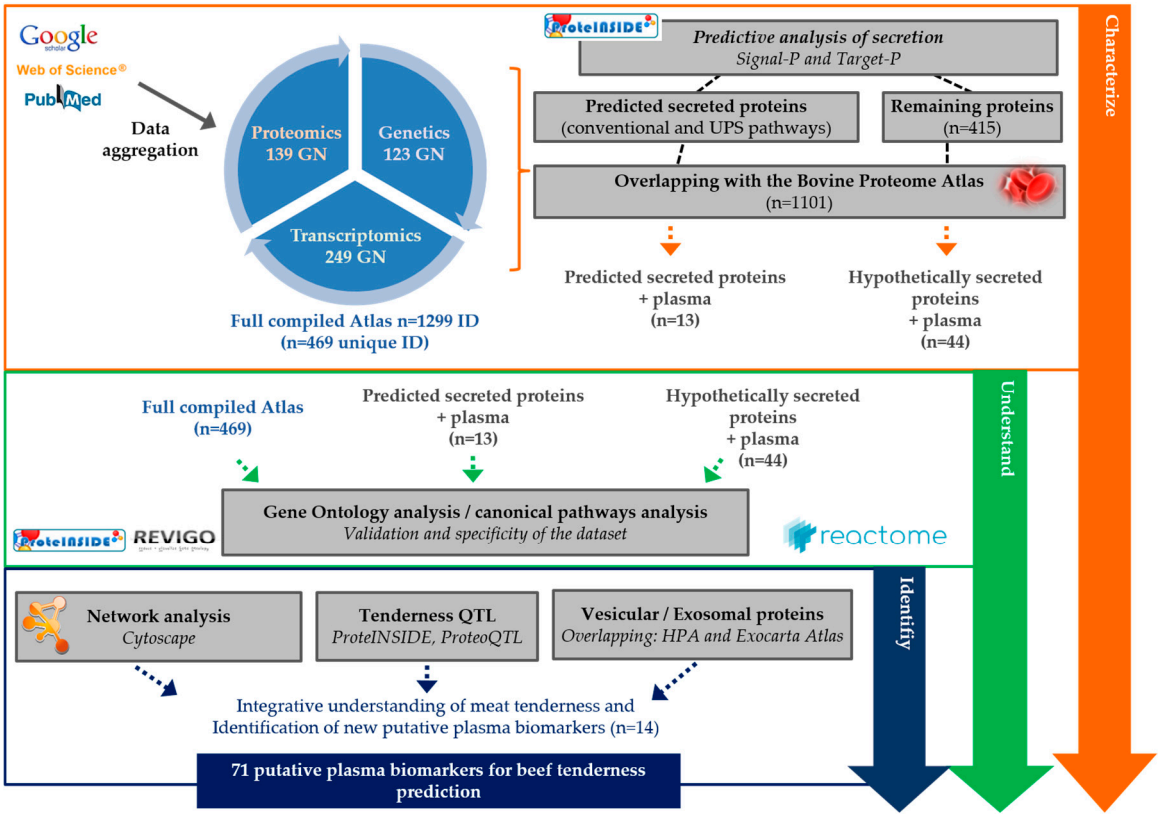


Figure 1. Flowchart of the workflow applied for the discovery of candidate plasma biomarkers for beef tenderness using a review of the literature and aggregation of omic data

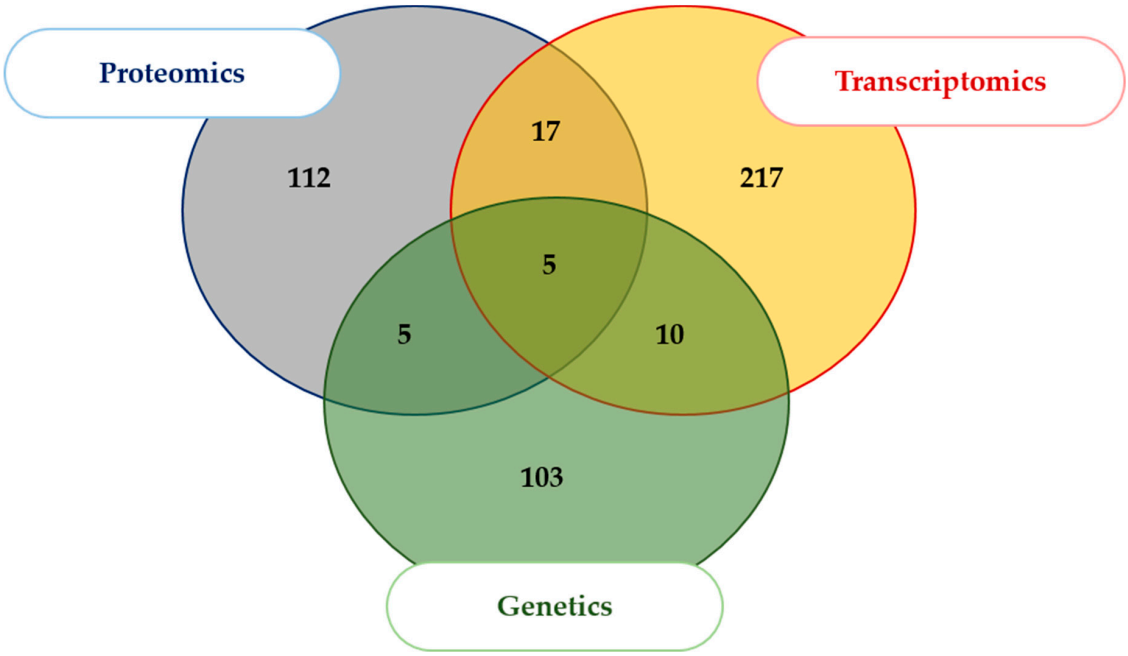


Figure 2. Origin of the omics data included in the study. The Venn diagram shows the intersects of the three omic datasets aggregated in the study. The aggregated dataset related to tenderness [64] was limited to the unique ID Gene Names.

Table 1. Description of the computational analysis of the datasets included in the study.

Dataset	Number of ID Gene Names	Predicted Secreted Proteins (Conventional Pathways)	Predicted Secreted Proteins (Unconventional Pathways, or UPS)	Remaining Proteins	Predicted Secreted Proteins (Conventional and UPS) + Plasma	Hypothetically Secreted Proteins + Plasma
Proteomics (26 Articles)	139	8	8	123	2	27
Transcriptomics (11 Articles)	249	29	18	202	6	19
Genetics (12 Articles)	123	19	14	90	5	6
General Bilan (Unique ID)	511 (469)	56 (54)	40 (36)	415 (379)	13 (13)	52 (44)

The table presents the number of ID Gene Names for each dataset. Predictive secreted proteins (conventional pathways, (i): number of ID Gene Names identified as predicted secreted with signal-P sequence using ProteINSIDE predictive analysis (Signal-P > 0.5; Target-P ≤ 2). Predictive secreted proteins (unconventional pathways (UPS), (ii): number of ID Gene Names identified as predicted secreted without signal-P sequence using ProteINSIDE predictive analysis (Target-P ≤ 3). Remaining proteins: number of ID Gene Names non-predicted as secreted using ProteINSIDE. Predicted secreted proteins (conventional and alternative) in plasma: Number of ID Gene Names: (i) and (ii) found in the plasma by overlapping with the Bovine Proteome Atlas (BPA). Other proteins hypothetically secreted in plasma: Remaining proteins that were found in plasma by overlapping with the Bovine Proteome Atlas (BPA). In brackets: number of unique ID Gene Names associated with each category of proteins in the aggregated dataset. Unconventional pathways of secretion (UPS).

2.2. Computational Prediction

Prediction of the secreted proteins. Table 1 illustrates the numbers and characteristics of the proteins associated with the omics datasets. The predictive analysis using ProteINSIDE from the aggregated dataset allowed us to identify 54 proteins (11.5%) as predicted secreted proteins according to a conventional pathway (with signal-P and/or TM domain) and 36 proteins (7.7%) as predicted secreted proteins according to UPS pathways (without signal-P). The list of remaining proteins included 379 GN (80.8%).

Prediction of the secreted proteins putatively found in the plasma. The intersection of the datasets and the Bovine Plasma proteome Atlas (BPA) allowed to retrieve proteins that may be secreted by conventional or by UPS pathways and found in the plasma, and the remaining proteins not hallmarked for secretion but found in the plasma respectively (Table 1). Thirteen proteins referred to as "predicted secreted proteins in plasma" (2.8%) and 44 proteins referred to as "hypothetically secreted proteins in plasma" (9.4%) were identified respectively (Table 1). These repertoires are presented in Table 2.

Table 2. List of the 71 candidate plasma proteins associated with beef tenderness.

ID Gene Name	QTL	EVs Proteins (HPA, n = 1998)	Exosomal Proteins (Exocarta, n = 100)
13 predicted secreted proteins + plasma (conventional and UPS)			
APOE		X	
ATP2A2	Shear force (Ch. 17)		
CDH13			
COL11A1			
CUBN			
EPHA7			
GAPDH		X	X
GLG1			
LGALS3BP			X
MPO		X	
PCDH7			
PRDX6			
TG			

Table 2. *Cont.*

ID Gene Name	QTL	EVs Proteins (HPA, *n* = 1998)	Exosomal Proteins (Exocarta, *n* = 100)
44 hypothetically secreted proteins + plasma			
ACTA1			
ACTB		X	
ACTC1	Tenderness score (Chr.10)		
ALB		X	
ATP5B			
BPGM			
CAPN2			
CASP8			
CCT8			
CENPF			
CKM			
COL13A1			
DES			
ENO3			
FASN		X	
FGF12			
FLNA		X	
GBP1			
HBB	Shear force (Ch.15)		
HSP90AA1	Shear force (Chr.21)	X	
HSPA1A		X	X
HSPA1B		X	
IGF1R		X	
LAMC1	Shear force (Chr.22)		
LDHA	Shear force (Ch.29)	X	X
LDHB	Shear force (Ch.5)	X	
LOX			
LRRC16A			
MYH2			
MYH3			
MYH7			
NID1			
PGAM2			
PGK1		X	
PPARG	Shear force (Chr.22)	X	
PRDX3			
PSMB2			
PVALB	Shear force (Chr.5)		
RGS2			
SDHB			
TPM1	Tenderness score (Chr.10)		
TPM3			
TUFM			
YWHAG		X	
14 plasma proteins from Network/QTL			
CASP8AP2	Tenderness score (Chr.9)		
ACTN1	Tenderness score (Chr.10)		
CAT	Shear force (Chr.15)	X	
CCNB2	Tenderness score (Chr.10)		
CFL1	Tenderness score and Shear force (Chr.29)		X
GSS	Shear force (Chr.13)		
MAPK1	Shear force (Chr.17)		
NEFL	Shear force (Chr.8)		

Table 2. *Cont.*

ID Gene Name	QTL	EVs Proteins (HPA, n = 1998)	Exosomal Proteins (Exocarta, n = 100)
PRKACB	Shear force (Chr.3)		
PSMA7	Shear force (Chr.13)		
USP8	Tenderness score (Chr.10)		
YWHAB	Shear force (Chr.13)		X
YWHAZ	Shear force (Chr.14)		X
ZBTB21	Shear force (Chr.1)		

We report all the proteins proposed as plasma candidates for beef tenderness: 13 predicted secreted proteins identified using ProteINSIDE tool, 44 hypothetically secreted found by overlapping the repertoire of proteins not hallmarked for secretion with the BPA, and 14 plasma proteins revealed from the network and QTL analysis. EVs: The vesicular proteins were retrieved by overlapping with the Vesicular protein Atlas from HPA. The exosome proteins were retrieved by overlapping with the Exosome proteins from Exocarta Atlas. BPA: Bovine Plasma proteome Atlas. The information on the location of the genes encoding proteins of interest within published QTL for tenderness retrieved using the ProteoQTL module of ProteINSIDE. This module interrogates a publicly available QTL library in Animal QTL database that contains cattle QTL and the published data associated. In brackets in the QTL column: chromosome associated with the Tenderness score and/or Shear force QTL. "X" means that the protein was found in the considered HPA and/or Exocarta atlas.

2.3. Gene Ontology

The full compiled atlas of 469 GN and the repertoires of 13 "predicted secreted proteins in plasma" and of 44 "hypothetically secreted proteins in plasma" were then submitted to Gene ontology (GO) annotation. The biological processes (BP) associated with the different datasets are presented in the Tables 3–5 respectively. The hierarchical "varonoi" visualization of the canonical pathways related to the 13 "predicted secreted proteins in plasma" and the 44 "hypothetically secreted proteins in plasma" are shown in Supplementary Data 1 and 2. A SimRel semantic rapprochement performed on the TOP50 of the GO terms associated with the 469 proteins (p-value adjusted <0.001, minimum of two proteins annotated in annotation) highlighted 10 BP: "Inflammatory response", "Gluconeogenesis", " Protein stabilization", "chaperone-mediated protein complex assembly", "Carbohydrate metabolism", "Aging", "Muscle contraction and development", "cell adhesion", "protein folding" and "Apoptotic process" (Table 3). Thanks to REVIGO semantic rapprochement performed on the GO terms associated with the 13 "predicted secreted proteins in "plasma" (p-value adj. <0.05, minimum of two proteins annotated in GO annotation), s BP were identified: "Cell adhesion", "Apoptotic process", "Endocytosis", "Response to oxidative stress", "Hydrogen peroxide metabolism" and "Lipid metabolism" (Table 4). In parallel, thanks to the Reactome visualization of the 13 "predicted secreted proteins"; four major canonical pathways were identified: "homeostasis", "signal transduction (receptor tyrosine kinase signaling, and NR1H2/H3 mediated signaling)", "immune system (neutrophil degranulation)" and "transport of small molecules (plasma lipoprotein assembly, remodeling, ABC transporter ion channel, mitochondrial calcium ion transport) (Supplementary Data 1). Thanks to semantic rapprochement performed on the GO terms associated with the 44 "hypothetically secreted proteins in plasma" (p-value adj. <0.001, minimum of two proteins annotated in GO annotation), 9 BP were identified: "Protein stabilization", "Gluconeogenesis", "response to ethanol", "Protein folding and chaperone-mediated protein complex assembly", "Endocytosis", "Muscle contraction", "Viral process" and "Hydrogen peroxide metabolism" (Table 5). In parallel, thanks to the Reactome visualization of the 44 "hypothetically secreted proteins in plasma"; 10 major canonical pathways were identified: "cell-cell communication", "homeostasis", "muscle contraction", "metabolism of proteins", "metabolism of lipids (citric acid cycle and carbohydrate metabolism)", "programmed cell death", "cellular responses to external stimuli", "organelle biogenesis and maintenance (cilium assembly . . .)", "autophagy", "extracellular matrix organization" (Supplementary Data 2). The comparison between the repertoires of 13 "predicted secreted proteins in plasma" and of 44 "hypothetically secreted proteins in plasma" revealed six common GO Biological Process including "receptor-mediated endocytosis", "cellular

response to oxidative stress", "hydrogen peroxide catabolic process", "neutrophil degranulation", "oxidation-reduction process" and "cellular oxidant detoxification" (Figure 3).

Table 3. TOP50 Gene Ontology terms associated with the 469 proteins of the aggregated dataset related to meat tenderness.

GO Term	Description	ID Gene Name	Enrichment in Dataset (%)	Enrichment in Genome Database (%)	*p*-value Adjusted
Inflammatory Response					
GO:0043312	neutrophil degranulation	*GDI2 ASAH1 PNP HSP90AA1 PGM1 PSMC2 PKM MPO PLAC8 HSPA1A PRDX6 PGAM1 CCT8 ALDOA HSPA1B ATP8B4 CLEC12A SERPINA3 HSPA6 GSTP1 HBB HSPA8 DNAJC3 ATP11ADGAT1*	6.14	5.17	1.98×10^{-22}
GO:0042493	response to drug	*ADA CASP3 SOD1 NPPC PPARG LOX ENO3 VAV3 ABCG5 LGALS1 CENPF AQP1 ACTC1 PNP CTNNB1 KCNK3 SST FABP3 LDHALCK*	4.91	5.39	2.53×10^{-18}
GO:0055085	transmembrane transport	*SLC6A9 ABCA12 VDAC2 CACNA1C SLC25A12 ABCG5 ANKH ITPR1 VDAC1 PSMB2 SLC6A20 HCN1 KCND2 SLCO3A1 SLC39A11 TRPM3 PSMC2 SLC9A9 AQP1 SLC9A7SLC25A48*	5.16	2.9	3.38×10^{-14}
GO:0098869	cellular oxidant detoxification	*PARK7 APOE ALB TXN PRDX3 PRDX6 GSTP1HBB*	1.97	50	3.99×10^{-14}
GO:0042542	response to hydrogen peroxide	*MB SIRT1 LDHA ADA PRDX3 PARK7 CAPN2 HBB CASP3 CRYAB HMOX1 SOD1*	2.95	11.11	1.71×10^{-14}
GO:0045471	response to ethanol	*GSTP1 MSTN LEP RGS2 CASP8 CA3 NQO1 ACTC1 TUFM NPPCSOD1*	2.7	9.32	1.38×10^{-12}
GO:0071356	cellular response to tumor necrosis factor	*BAG4 SIRT1 GPD1 FABP4 CCL25 MYOD1 ZFP36L1 GBP1 GBP3ASAH1*	2.46	9.01	2.31×10^{-11}
> GO:0071346	cellular response to interferon-gamma	*GBP7 GBP3 CCL25 GBP6 GBP1 GBP5GAPDH*	1.72	12.5	$5.78 \text{ x } 10^{-9}$

Table 3. *Cont.*

GO Term	Description	ID Gene Name	Enrichment in Dataset (%)	Enrichment in Genome Database (%)	*p*-value Adjusted
GO:0032355	response to estradiol	*LEP GSTP1 CTNNB1 CRYAB OXT PTGFR CASP3 NQO1 CASP8 GHR*	2.46	7.87	7.59×10^{-11}
GO:0006811	ion transport	*VDAC2 KCND2 ATP2A2 CACNA1C KCNK3 SLCO3A1 HCN1 VDAC1 ITPR1 KCNJ3 CACNA2D1 SLC9A9 SLC9A7 TRPM3 ATP5PD SLC39A11 SCN2B CLCA3P KCNJ15 CHRNE*	4.91	1.87	2.33×10^{-10}
GO:0034620	cellular response to unfolded protein	*HSPA6 HSPA9 HSPA1A HSPA8 HSPA1B*	1.23	83.33	1.09×10^{-9}
> GO:0006986	response to unfolded protein	*HSPA9 HSPB1 HSPA1B HSPA8 DNAJC3 DNAJA1 DNAJB5 HSPA6 HSP90AA1 HSPH1 HSPB2 HSPA1A*	2.95	25	3.40×10^{-18}
GO:1900034	regulation of cellular response to heat	*BAG4 HSPA1B HSPA8 CRYAB SIRT1 HSPA1A HSPH1 HSP90AA1*	1.97	10.26	1.44×10^{-9}
GO:0032869	cellular response to insulin stimulus	*GCLC PKM PPARG ZFP36L1 GOT1 YWHAG GSTP1 LEP*	1.97	10.13	1.54×10^{-9}
GO:0009409	response to cold	*CASP8 CXCL10 PPARG METRNL PLAC8 HSP90AA1 ACADVL*	1.72	14.89	2.03×10^{-9}
> GO:0034605	cellular response to heat	*HSP90AA1 HMOX1 HSPA8 CXCL10 HSPA1B HSPA6 HSPA9 HSPA1A ATP2A2*	2.21	19.57	6.79×10^{-13}
GO:0001666	response to hypoxia	*CASP3 HMOX1 CRYAB PKM MB ADA NPPC LEP CAPN2 ITPR1 LDHA*	2.7	4.17	3.16×10^{-9}
GO:0006979	response to oxidative stress	*PRDX6 MPO SGK2 HMOX1 SIRT1 CA3 NQO1 APOE PRDX3 GCLC NDUFB4 SOD1*	2.95	3.48	3.35×10^{-9}
GO:0006954	inflammatory response	*IDO1 NFATC3 CSRP3 CCR5 CCR3 CCL25 CXCL10 FOLR2 SERPINA3 PTGFR RPS6KA4 PARK7 GBP5*	3.19	2.97	3.66×10^{-9}

Table 3. *Cont.*

GO Term	Description	ID Gene Name	Enrichment in Dataset (%)	Enrichment in Genome Database (%)	*p*-value Adjusted
Gluconeogenesis					
GO:0055114	oxidation-reduction process	*PTGR1 LDHB GAPDH NDUFV2 SOD1 TXN PRDX6 NDUFB4 HGD VAT1L LOX NDUFS3 NDUFV1 MDH1 MDH2 ME2 ALDH2 LDHA UQCRC1 MPO NQO1 ACADVL BCKDHB PDHB NDUFS1 DMGDH IDH3A NDUFA10 SOD2 WWOX UQCRH IDO1 PRDX3 HMOX1 ALDH1B1 SDHB GPD1 FASN*	9.34	8.48	2.82×10^{-41}
GO:0006094	gluconeogenesis	*ENO1 ENO3 PGAM2 SLC25A12 GOT1 TPI1 MDH1 PGAM1 PGM1 PGK1 SDS GPD1 GAPDH ALDOA MDH2*	3.69	34.09	2.02×10^{-24}
GO:0061621	canonical glycolysis	*PKM ENO1 PGAM1 TPI1 PGAM2 BPGM PGK1 PFKM ENO3 ALDOA GAPDH*	2.7	40.74	1.40×10^{-18}
GO:0046034	ATP metabolic process	*MYH4 MYH7 ATP5PD NDUFS1 MYH8 HSPA1B HSPA1A ATP5B ENPP3 MYH3 AK1 HSPA8*	2.95	10.26	3.83×10^{-14}
> GO:0006096	glycolytic process	*PGM1 PRKAG3 GAPDH PGK1 ENO1 BPGM PGAM1 PFKM PKM PGAM2 ALDOA ENO3 TPI1 LDHA*	3.44	35.9	4.62×10^{-23}
GO:0006099	tricarboxylic acid cycle	*IDH3A DLST ME2 PDHB IREB2 MDH2 MDH1 SDHB*	1.97	26.67	2.12×10^{-12}
Protein Stabilization					
GO:0050821	protein stabilization	*HSPA1A GAPDH PFN1 PARK7 SAXO1 PHB HSP90AA1 HSPA1B CRYAB CCT8 PPIB FLNA*	2.95	7.89	6.22×10^{-13}
GO:0045944	positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	*NFATC3 EBF1 PARK7 RPS6KA4 MYOD1 CSRP3 SMAD1 PLAC8 SOX5 SIRT1 MYT1 TBX15 WWOX PAX7 NLRC5 CTNNB1 CDH13 CXCL10 PFKM PPARG SIM1*	5.16	2.22	3.70×10^{-12}

Table 3. *Cont.*

GO Term	Description	ID Gene Name	Enrichment in Dataset (%)	Enrichment in Genome Database (%)	*p*-value Adjusted
> GO:0000122	negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	*PPARG WWOX DNAJB5 TBX15 LEP PHB CUX2 CXXC5 AURKB TENM2 STRAP EHMT1 SIRT1 CTNNB1 COPS2 TXN RORC ENO1*	4.42	2.65	1.15×10^{-11}
GO:1904706	negative regulation of vascular smooth muscle cell proliferation	*HMOX1 GSTP1 PPARG TPM1 SOD2*	1.23	55.56	4.17×10^{-9}
GO:0008285	negative regulation of cell proliferation	*SPRY1 CTNNB1 CGREF1 CDH13 NPPC PPARG FABP3 SOD2 SST HMOX1 HSPA1A PTPRK PHB HSPA1B CLDN19*	3.69	2.29	4.81×10^{-9}
GO:0030308	negative regulation of cell growth	*NDUFS3 ENO1 CRYAB HSPA1B PHB HSPA1A SIRT1 MYL2 PPARG APBB2*	2.46	6.25	5.75×10^{-10}
GO:0046716	muscle cell cellular homeostasis	*PFKM CFL2 ALDOA MSTN SOD1 LOX*	1.47	31.58	9.74×10^{-10}
Chaperone-Mediated Protein Complex Assembly					
GO:0051085	chaperone mediated protein folding requiring cofactor	*HSPA1B HSPA9 HSPA8 HSPH1 HSPA1A DNAJB5 HSPA6*	1.72	53.85	1.52×10^{-12}
GO:0042026	protein refolding	*PPIB HSPA8 HSPA6 HSPA1A HSPA1B HSPA9 HSP90AA1*	1.72	33.33	1.94×10^{-11}
Carbohydrate Metabolism					
GO:0005975	carbohydrate metabolic process	*PYGM ALDH2 PGM1 LCT PDK4 GPD1 MDH1 LDHB LDHA ALDH1B1 BPGM POFUT2 PDHB MDH2 IDH3A*	3.69	3.25	5.93×10^{-11}
Aging					
GO:0045214	sarcomere organization	*TPM1 FHOD3 WDR1 TNNT1 MYH3 TNNT3 CFL2 KLHL41 CSRP3*	2.21	23.68	1.59×10^{-13}
> GO:0007517	muscle organ development	*MYOD1 CSRP3 PAX7 CRYAB MYH3 FHL3 CENPF CXCL10 MSTN SIRT1*	2.46	9.62	1.31×10^{-11}
GO:0007568	aging	*PBEF1 GCLC ENO3 AURKB SOD1 CNP CRYAB CTNNA1 ADA MPO NQO1*	2.7	4.45	1.67×10^{-9}

Table 3. *Cont.*

GO Term	Description	ID Gene Name	Enrichment in Dataset (%)	Enrichment in Genome Database (%)	*p*-value Adjusted
Muscle Contraction and Development					
GO:0006936	muscle contraction	*CHRNE CRYAB DES MYH8 MYH1 TNNT3 MYL6B MYH7 MYH4 TNNI2 ACTA1 MYLPF TNNT1 MYL1 MYH2 TPM1 TPM3 CKMT2*	4.42	8.45	1.09×10^{-19}
> GO:0003009	skeletal muscle contraction	*MYH3 TNNT1 TNNI2 MYH8 ATP2A2 MYH7 TNNT3*	1.72	25.93	8.00×10^{-11}
> GO:0030049	muscle filament sliding	*DES MYL3 TPM1 TNNT1 MYL1 MYH3 TNNT3 MYL2 ACTN3 MYH8 MYH4 MYH2 TPM3 ACTC1 MYH7 ACTA1 TNNI2 MYL6B*	4.42	47.37	2.23×10^{-31}
> GO:0060048	cardiac muscle contraction	*CSRP3 TPM1 TNNT3 MYL1 TNNT1 MYH7 TNNI2 MYL2 MYL3 SCN2B ACTC1*	2.7	24.44	2.28×10^{-16}
GO:0007275	multicellular organism development	*NFATC3 TAPT1 SEMA3E COL13A1 RECQL4 SIM1 SIRT1 TNP1 EBF1 SPRY1 PRRX2 PPARG MYOD1 CSRP3 LRP4 CENPF PAX7 ZFP36L1 MYT1 RORC CYLC1 EPHA7 TPI1*	5.65	3.36	8.30×10^{-17}
> GO:0007507	heart development	*FGF12 PPARG CASP3 RBM20 CACNA1C CTNNB1 OXT LOX ZFP36L1 MB MYL2 CSRP3*	2.95	6.86	2.74×10^{-12}
Cell Adhesion					
GO:0007155	cell adhesion	*TROAP NID1 CTNNA3 TENM2 LYVE1 NTM CCR3 LAMA3 ADA CTNNA1 CDH13 MYBPH ATP2A2 CGREF1 COL13A1 PCDH7 LAMC1 MPDZ PTPRK DDR2 DSCAML1 LGALS3BP CTNNB1*	5.65	2.74	5.07×10^{-15}
Protein Folding					
GO:0006457	protein folding	*HSPA9 DNAJA1 CRYAB NPPC CCT8 PPIB HSP90AA1 DNAJB11 DNAJB5 BAG4 HSPA8*	2.7	4.85	7.57×10^{-10}

Table 3. *Cont.*

GO Term	Description	ID Gene Name	Enrichment in Dataset (%)	Enrichment in Genome Database (%)	*p*-value Adjusted
Apoptotic Process					
GO:0006915	apoptotic process	*SHC4 TMEM14A ZFP36L1 PRDX3 AVEN BCL2L14 GAPDH NSG1 EPHA7 LGALS1 CASP3 CASP8 HMOX1 SIRT1 ITPR1 HINT1 VDAC1 WWOX*	4.42	3.01	1.67×10^{-12}
> GO:0043066	negative regulation of apoptotic process	*CTNNB1 DNAJC3 HSPB1 NQO1 AQP1 TMEM14A ACTC1 HSPA9 HSPA1B MPO GSTP1 AVEN GCLC SOD1 PARK7 CRYAB ADA IGF1R CASP3 BAG4 PLAC8 SIRT1 DNAJA1 PTGFR PKHD1 HSPA1A CTNNA1 ALB FLNA PRDX3 PAX7 LEP APBB2*	8.11	4.02	3.58×10^{-26}

We report the Top5O of the "Biological process" Gene Ontology terms identified with a significant *p*-value (*p*-value < 0.001) and associated with a minimum of two proteins. This GO Table was obtained using REVIGO (semantic SimRel measure) including GO terms and *p*-value parameters. ID Gene Name: Proteins identified as related with tenderness within each Gene Ontology group. Enrichment in Dataset (%): Percentage of enrichment within the dataset. Enrichment in genome Database (%): Percentage of enrichment without the genome Database used by the ProteINSIDE algorithm analysis. (">" GO term): GO term included in up-GO term by removing redundant GO terms.

Table 4. Gene Ontology of the 13 predicted secreted proteins in plasma.

GO Term	Description	ID Gene Name	Enrichment in Dataset (%)	Enrichment in Genome Database (%)	*p*-Value Adjusted
Cell Adhesion					
GO:0007155	cell adhesion	*PCDH7 LGALS3BP ATP2A2 CDH13*	30.77	0.48	4.00×10^{-5}
> GO:0007156	homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules	*CDH13 PCDH7*	15.38	1.28	1.17×10^{-3}
Apoptotic Process					
GO:0006874	cellular calcium ion homeostasis	*APOE ATP2A2*	15.38	0.55	1.98×10^{-3}
> GO:0045454	cell redox homeostasis	*PRDX6 MPO*	15.38	2.78	3.38×10^{-4}
GO:0006915	apoptotic process	*EPHA7 GAPDH*	15.38	0.33	3.04×10^{-3}
Endocytosis					
GO:0002576	platelet degranulation	*PCDH7 LGALS3BP*	15.38	1.63	7.81×10^{-4}

Table 4. *Cont.*

GO Term	Description	ID Gene Name	Enrichment in Dataset (%)	Enrichment in Genome Database (%)	*p*-Value Adjusted
> GO:0043312	neutrophil degranulation	*MPO PRDX6*	15.38	0.41	2.54×10^{-3}
GO:0034599	cellular response to oxidative stress	*ATP2A2 PRDX6*	15.38	1.03	1.32×10^{-3}
GO:0006898	receptor-mediated endocytosis	*APOE CUBN*	15.38	0.86	1.44×10^{-3}
GO:0006897	endocytosis	*LGALS3BP CUBN*	15.38	0.49	2.19×10^{-3}
Response to Oxidative Stress					
GO:0098869	cellular oxidant detoxification	*PRDX6 APOE*	15.38	12.5	3.70×10^{-5}
GO:0006979	response to oxidative stress	*APOE MPO PRDX6*	23.08	0.87	9.90×10^{-5}
GO:0050832	defense response to fungus	*MPO GAPDH*	15.38	4.44	1.54×10^{-4}
GO:0055114	oxidation-reduction process	*MPO GAPDH PRDX6*	23.08	0.67	1.78×10^{-4}
Hydrogen Peroxide Metabolism					
GO:0042744	hydrogen peroxide catabolic process	*PRDX6 MPO*	15.38	10.53	4.40×10^{-5}
Lipid Metabolism					
GO:0034384	high-density lipoprotein particle clearance	*CUBN APOE*	15.38	22.22	2.20×10^{-5}
> GO:0034374	low-density lipoprotein particle remodeling	*APOE MPO*	15.38	15.38	3.00×10^{-5}
GO:0008203	cholesterol metabolic process	*CUBN APOE*	15.38	1.82	6.70×10^{-4}
GO:0006629	lipid metabolic process	*APOE CUBN PRDX6*	23.08	0.27	1.32×10^{-3}
GO:0008202	steroid metabolic process	*CUBN APOE*	15.38	0.8	1.44×10^{-3}
GO:0032496	response to lipopolysaccharide	*MPO ATP2A2*	15.38	0.72	1.56×10^{-3}

We report all of the "Biological Process" terms associated with the Gene Ontology annotations identified with significant *p*-values (p-value < 0.05) and associated with minimum of two proteins. This GO Table was obtained using REVIGO (semantic SimRel measure) including GO terms and *p*-value parameters. ID Gene Name: Proteins identified as related with tenderness within each Gene Ontology group. Enrichment in Dataset (%): Percentage of enrichment within the dataset. Enrichment in genome Database (%): Percentage of enrichment without the genome Database used by the ProteINSIDE algorithm analysis. (">" GO term): GO term included in up-GO term by removing redundant GO terms.

Table 5. Gene Ontology of the 44 hypothetically secreted proteins in plasma.

GO Term	Function	*ID Gene Name*	Enrichment in Dataset (%)	Enrichment in Genome Database (%)	*p*-Value Adjusted
Muscle Contraction, Structure and Development					
GO:0030049	muscle filament sliding	*DES ACTC1 ACTA1 MYH7 TPM3 TPM1 MYH3 MYH2*	18.18	21.05	1.80×10^{-18}
GO:0006936	muscle contraction	*MYH2 TPM3 ACTA1 DES TPM1 MYH7*	13.64	2.82	2.32×10^{-9}
GO:0050821	protein stabilization	*HSPA1B CCT8 FLNA HSPA1A HSP90AA1*	11.36	3.29	3.27×10^{-8}
GO:0090063	positive regulation of microtubule nucleation	*HSPA1A HSPA1B*	4.55	50	1.40×10^{-5}
GO:0030240	skeletal muscle thin filament assembly	*ACTC1 ACTA1*	4.55	40	1.82×10^{-5}
GO:0030198	extracellular matrix organization	*LAMC1 COL13A1 LOX NID1*	9.09	1.34	1.97×10^{-5}
GO:0007507	heart development	*LOX PPARG FGF12*	6.82	1.71	1.43×10^{-4}
GO:0007015	actin filament organization	*TPM3 TPM1 ACTC1*	6.82	1.54	1.87×10^{-4}
GO:0003009	skeletal muscle contraction	*MYH7 MYH3*	4.55	7.41	2.22×10^{-4}
GO:0045214	sarcomere organization	*MYH3 TPM1*	4.55	5.26	3.97×10^{-4}
GO:0021762	substantia nigra development	*LDHA ACTB*	4.55	4.76	4.57×10^{-4}
GO:0055010	ventricular cardiac muscle tissue morphogenesis	*MYH7 TPM1*	4.55	4.26	5.43×10^{-4}
Muscle Energy Metabolism					
GO:0006096	glycolytic process	*PGAM2 LDHA PGK1 BPGM ENO3*	11.36	12.82	8.64×10^{-11}
GO:0061621	canonical glycolysis	*PGAM2 BPGM PGK1 ENO3*	9.09	14.81	6.04×10^{-9}
GO:0046034	ATP metabolic process	*HSPA1A MYH3 HSPA1B MYH7 ATP5B*	11.36	4.27	1.02×10^{-8}
GO:0055114	oxidation-reduction process	*LDHA LDHB FASN SDHB LOX PRDX3*	13.64	1.34	1.25×10^{-7}
GO:0006094	gluconeogenesis	*PGK1 ENO3 PGAM2*	6.82	6.82	4.83×10^{-6}
GO:0060048	cardiac muscle contraction	*MYH7 TPM1 ACTC1*	6.82	6.67	5.06×10^{-6}

Table 5. *Cont.*

GO Term	Function	*ID Gene Name*	Enrichment in Dataset (%)	Enrichment in Genome Database (%)	*p*-Value Adjusted
Apoptosis, Death Cell and Proteolysis					
GO:0043066	negative regulation of apoptotic process	*HSPA1A FLNA ALB IGF1R PRDX3 HSPA1B ACTC1*	15.91	0.85	1.38×10^{-7}
GO:1903265	positive regulation of tumor necrosis factor-mediated signaling pathway	*HSPA1A HSPA1B*	4.55	33.33	2.19×10^{-5}
GO:0038096	Fc-gamma receptor signaling pathway involved in phagocytosis	*ACTB MYH2 HSP90AA1*	6.82	2.27	7.01×10^{-5}
GO:1900740	positive regulation of protein insertion into mitochondrial membrane involved in apoptotic signaling pathway	*CASP8 YWHAG*	4.55	6.67	2.67×10^{-4}
GO:0006898	receptor-mediated endocytosis	*ALB HSP90AA1 HBB*	6.82	1.29	2.99×10^{-4}
GO:2001240	negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway in absence of ligand	*HSPA1B HSPA1A*	4.55	5.71	3.46×10^{-4}
GO:0032757	positive regulation of interleukin-8 production	*HSPA1A HSPA1B*	4.55	4.44	5.11×10^{-4}
Oxidative Stress and HSP Proteins					
GO:0098869	cellular oxidant detoxification	*PRDX3 ALB HBB*	6.82	18.75	4.68×10^{-7}
GO:0042542	response to hydrogen peroxide	*LDHA HBB CAPN2 PRDX3*	9.09	3.7	7.05×10^{-7}
GO:0090084	negative regulation of inclusion body assembly	*HSPA1A HSPA1B*	4.55	18.18	5.46×10^{-5}

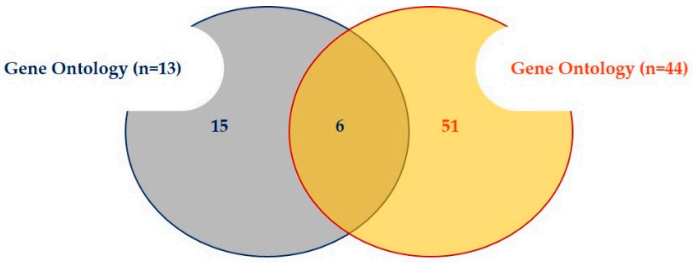
Table 5. *Cont.*

GO Term	Function	*ID Gene Name*	Enrichment in Dataset (%)	Enrichment in Genome Database (%)	*p*-Value Adjusted
GO:0042744	hydrogen peroxide catabolic process	*PRDX3 HBB*	4.55	10.53	1.25×10^{-4}
GO:0034599	cellular response to oxidative stress	*HSPA1B HSPA1A PRDX3*	6.82	1.55	1.86×10^{-4}
GO:0045429	positive regulation of nitric oxide biosynthetic process	*HBB HSP90AA1*	4.55	4.88	4.40×10^{-4}
Metabolism, Transport and Cell Signaling					
GO:0042493	response to drug	*PPARG CENPF LDHA LOX ACTC1 ENO3*	13.64	1.62	4.29×10^{-8}
GO:0042026	protein refolding	*HSPA1A HSP90AA1 HSPA1B*	6.82	14.29	8.17×10^{-7}
GO:0045471	response to ethanol	*RGS2 ACTC1 CASP8 TUFM*	9.09	3.39	8.78×10^{-7}
GO:0034605	cellular response to heat	*HSPA1A HSPA1B HSP90AA1*	6.82	6.52	5.30×10^{-6}
GO:0009409	response to cold	*HSP90AA1 PPARG CASP8*	6.82	6.38	5.55×10^{-6}
GO:0006986	response to unfolded protein	*HSPA1B HSP90AA1 HSPA1A*	6.82	6.25	5.80×10^{-6}
GO:0070370	cellular heat acclimation	*HSPA1B HSPA1A*	4.55	66.67	9.89×10^{-6}
GO:0070434	positive regulation of nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 signaling pathway	*HSPA1B HSPA1A*	4.55	66.67	9.89×10^{-6}
GO:0090131	mesenchyme migration	*ACTC1 ACTA1*	4.55	40	1.82×10^{-5}
GO:1900034	regulation of cellular response to heat	*HSPA1A HSPA1B HSP90AA1*	6.82	3.85	1.88×10^{-5}
GO:0034620	cellular response to unfolded protein	*HSPA1A HSPA1B*	4.55	33.33	2.19×10^{-5}
GO:0010389	regulation of G2/M transition of mitotic cell cycle	*YWHAG CENPF HSP90AA1*	6.82	2.56	5.37×10^{-5}

Table 5. *Cont.*

GO Term	Function	*ID Gene Name*	Enrichment in Dataset (%)	Enrichment in Genome Database (%)	*p*-Value Adjusted
GO:0051085	chaperone cofactor-dependent protein refolding	*HSPA1A HSPA1B*	4.55	15.38	7.01×10^{-5}
GO:0051092	positive regulation of NF-kappaB transcription factor activity	*PRDX3 HSPA1B HSPA1A*	6.82	2.24	7.18×10^{-5}
GO:1901673	regulation of mitotic spindle assembly	*HSPA1A HSPA1B*	4.55	13.33	8.55×10^{-5}
GO:0051131	chaperone-mediated protein complex assembly	*HSPA1A HSP90AA1*	4.55	12.5	9.52×10^{-5}
GO:0030308	negative regulation of cell growth	*HSPA1A HSPA1B PPARG*	6.82	1.88	1.14×10^{-4}
GO:0046718	viral entry into host cell	*HSPA1A HSPA1B*	4.55	9.09	1.61×10^{-4}
GO:0031396	regulation of protein ubiquitination	*HSPA1A HSPA1B HSP90AA1*	6.82	1.14	4.03×10^{-4}
GO:0001895	retina homeostasis	*ACTB ALB*	4.55	5	4.23×10^{-4}
GO:0046677	response to antibiotic	*CASP8 HSP90AA1*	4.55	4.08	5.85×10^{-4}
Immune System and Blood Coagulation					
GO:0070527	platelet aggregation	*HBB FLNA ACTB*	6.82	7.14	4.46×10^{-6}
GO:0043312	neutrophil degranulation	*HBB HSPA1B HSP90AA1 CCT8 HSPA1A*	11.36	1.03	4.83×10^{-6}
GO:1904706	negative regulation of vascular smooth muscle cell proliferation	*PPARG TPM1*	4.55	22.22	4.11×10^{-5}
GO:0030224	monocyte differentiation	*FASN PPARG*	4.55	11.76	1.05×10^{-4}
GO:0045648	positive regulation of erythrocyte differentiation	*HSPA1B HSPA1A*	4.55	8.7	1.72×10^{-4}

We report all of the Biological Process associated with the Gene Ontology annotations identified with a significant *p*-values (p-value < 0.001) and associated with minimum of two proteins. This GO Table was obtained using REVIGO (semantic SimRel measure) including GO terms and *p*-value parameters. ID Gene Name: Proteins identified as related with tenderness within each Gene Ontology group. Enrichment in Dataset (%): Percentage of enrichment within the dataset. Enrichment in genome Database (%): Percentage of enrichment without the genome Database used by the ProteINSIDE algorithm analysis. (">" GO term): GO term included in up-GO term by removing redundant GO terms.



Common GO terms (n=6)	Function	13 secreted predicted plasma proteins	44 hypothetically secreted plasma proteins
GO:0006898	receptor-mediated endocytosis	APOE CUBN	ALB HSP90AA1 HBB
GO:0034599	cellular response to oxidative stress	ATP2A2 PRDX6	HSPA1B HSPA1A PRDX3
GO:0042744	hydrogen peroxide catabolic process	PRDX6 MPO	PRDX3 HBB
GO:0043312	neutrophil degranulation	MPO PRDX6	HBB HSPA1B HSP90AA1 CCT8 HSPA1A
GO:0055114	oxidation-reduction process	MPO GAPDH PRDX6	LDHA LDHB FASN SDHB LOX PRDX3
GO:0098869	cellular oxidant detoxification	PRDX6 APOE	PRDX3 ALB HBB

Figure 3. Comparison of the list of Gene Ontology terms identified in the 13 secreted plasma proteins + plasma and 44 hypothetically secreted proteins + plasma.

2.4. Network Analysis and Plasma PPi Identification

Examination of the network built from all of the 57 plasma candidates identified in this study (13 "predicted secreted proteins in plasma" and 44 "hypothetically secreted proteins in plasma" combined) revealed 544 interactors of which 75 proteins were present in the BPA (Figure 4). Eleven proteins out of the 57 plasma candidates (ATP5B, BPGM, COL11A1, COL13A1, ENO3, FGF12, LRRC16A, PCDH7, PGAM2, PVALB and TG) were not included in the MINT database used to generate the network from Cytoscape. Finally, the investigation of these 75 candidate proteins allowed to identify 14 additional proteins (CASP8AP2, ZBTB21, USP8, NEFL, CAT, GSS, PRKACB, CFL1, MAPK1, CCNB2, ACTN1, YWHAZ, YWHAB and PSMA7) that could be new meat tenderness proteins located in cattle meat Quantitative trait *loci* (QTL) for Shear force and/or Tenderness score (Table 2). These 14 proteins were included in the repertoire of the "secreted proteins in plasma". Thus, a repertoire of 71 non-redundant candidate plasma proteins related to tenderness was generated (Table 2).

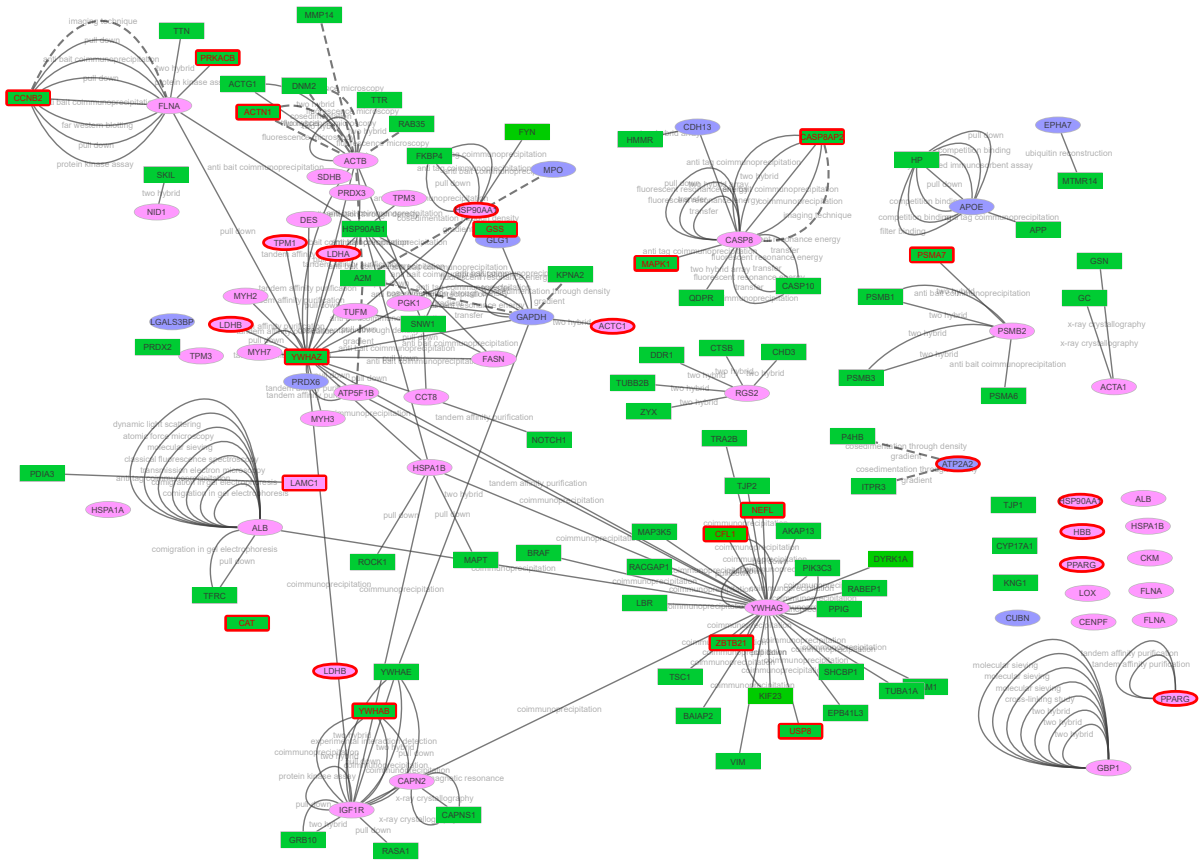


Figure 4. Network of the 71 plasma proteins identified in this study as putative candidate biomarkers for beef tenderness. This network reports the 71 plasma proteins identified as candidate biomarkers for meat tenderness in this study. The 13 predicted secreted proteins in plasma (conventional and alternative pathways) are shown in purple ellipse. The 44 hypothetically secreted proteins in plasma are shown in pink ellipse. The green rectangle refer to interactor identified through the up to date Cytoscape tool (MINT resource, Psciquic web service, 2017-12-17). The border red rectangle refer to the interactors located in cattle meat QTL for Shear force and/or Tenderness score tenderness (ProteINSIDE ProteoQTL analysis). Solid line shows the "primary interaction type". Dotted line shows the interaction through "detection method". Eleven out of the 57 plasma candidates (ATP5B, BPGM, COL11A1, COL13A1, ENO3, FGF12, LRRC16A, PCDH7, PGAM2, PVALB and TG), not included in the MINT database, are not shown in this network.

2.5. Identification of the Extracellular Vesicles (EVs) Proteins

The overlapping of the 71 plasma candidates with the vesicular proteins atlas (HPA) and the Exosome protein atlas (Exocarta) respectively allowed identifying several proteins likely to be secreted through EVs pathways. Thus, 13 vesicular proteins (ACTB, ALB, APOE, FASN, FLNA, HSP90AA1, HSPA1B, IGF1R, LDHB, MPO, PGK1, PPARG and YWHAG), two exosomal proteins (LGALS3BP and CFL1), and three proteins identified simultaneously as vesicular proteins and exosomal proteins (GAPDH, HSPA1A, and LDHA). Finally, 18 putative EVs proteins could be detected in the repertoire of candidate plasma tenderness proteins identify in this study.

2.6. QTL Investigation

As seen previously, 14 proteins were identified as located in cattle meat QTL for Shear force and/or Tenderness score from the network analysis (Table 2). Moreover, out of the 57 plasma candidates, 10 proteins including ATP2A2 (Chr. 17), HBB (Chr.15), HSP90AA1 (Chr.21), LAMC1 (Chr.22), LDHA (Chr.29), LDHB (Chr.5), PPARG (Chr.22), PVALB (Chr.5) were located in a cattle QTL for Shear force and ACTC1 (Chr.10), TPM1 (Chr.10) located in a cattle QTL for Tenderness score (Table 2).

3. Discussion

As a potential rich source of biomarkers, secreted proteins are targeted by biologists for the discovery of biomarkers [65] especially because they reflect various states of the cells at real time under given conditions. More specifically, secreted proteins in plasma are promising for the identification of low invasive biomarkers circulating in the bloodstream. Therefore, we assumed that in silico prediction of the secretome might help us discovering candidate biomarkers for beef tenderness in the plasma. As a first step in the biomarker identification workflow [66], we designed a study based on the review of the literature and the aggregation of molecular data related to meat tenderness. According to Bonnet et al. [67], we performed a computational reconstruction of the secretome putatively linked to tenderness from the aggregated data, and searched for proteins secreted in the plasma. With this approach, we proposed a list of 71 putative plasma proteins to be investigated further as candidate plasma biomarkers for meat tenderness. Four other plasma candidates from recent literature will thereby expand this list through this discussion. Thus, from this final list of 75 candidate biomarkers, we propose a list of 33 proteins, which are particularly promising for meat tenderness (Table 6).

Table 6. List of the 33 promising plasma biomarkers associated with beef tenderness identified in this study.

ID Gene Name	QTL	Overlapping (Picard & Gagaoua 2019)	Promising Candidates
31 plasma candidate biomarkers identify through this study			
ATP2A2	Shear force (Ch. 17)		X
GAPDH		X	X
ACTA1		X	X
ACTC1	Tenderness score (Chr.10)		X
ALB		X	X
ENO3		X	X
HBB	Shear force (Ch.15)		X
HSP90AA1	Shear force (Chr.21)		X
LAMC1	Shear force (Chr.22)		X
LDHA	Shear force (Ch.29)		X
LDHB	Shear force (Ch.5)		X
MYH7		X	X
PPARG	Shear force (Chr.22)		X

Table 6. *Cont.*

ID Gene Name	QTL	Overlapping (Picard & Gagaoua 2019)	Promising Candidates
PVALB	Shear force (Chr.5)		X
TPM1	Tenderness score (Chr.10)		X
CASP8AP2	Tenderness score (Chr.9)		X
ACTN1	Tenderness score (Chr.10)		X
CAT	Shear force (Chr.15)		X
CCNB2	Tenderness score (Chr.10)		X
CFL1	Tenderness score and Shear force (Chr.29)		X
GSS	Shear force (Chr.13)		X
MAPK1	Shear force (Chr.17)		X
NEFL	Shear force (Chr.8)		X
PRKACB	Shear force (Chr.3)		X
PSMA7	Shear force (Chr.13)		X
USP8	Tenderness score (Chr.10)		X
YWHAB	Shear force (Chr.13)		X
YWHAZ	Shear force (Chr.14)		X
ZBTB21	Shear force (Chr.1)		X
4 putative plasma candidates identify from Picard and Gagaoua, 2020			
COL4A1		X	X
HSPA5		X	X
ORM1		X	X
PDIA3		X	X

We report the 33 promising plasma candidate biomarkers for meat tenderness identified in this study. In brackets in the QTL column: chromosome associated with the Tenderness score and/or Shear force QTL. The first 29 promising candidates were selected when located in tenderness QTL (n = 24) and/or identified (n = 5) in [67]. The four plasma proteins reported at the bottom of table were obtained by overlapping between the BPA and the list of 67 putative muscle biomarkers published in [67]. These four proteins were predicted as secreted proteins (conventional pathways) using ProteINSIDE. "X" means that the protein was found in the Picard and Gagaoua 2019 and/or identify as promising candidate biomarkers.

3.1. Relevance of the Aggregated Dataset

Over the last two decades, 44 studies meeting our criteria of inclusion have identified genetic markers, and proteins or transcripts of which the abundance was related to tenderness. Some of them were proposed as muscle-derived biomarkers for meat quality [68]. These studies corresponded to less than 10% of the curated articles on meat tenderness. From this corpus, we aggregated a full compiled Atlas comprising 469 unique Gene Names, which we considered sufficient for further information mining. From this non-exhaustive dataset, we were able to identify 71 plasma candidate biomarkers for beef tenderness. Moreover, by comparison of the full compiled Atlas with the 67 proteins proposed recently in Picard et al. [68], four additional proteins (COL4A1, HSPA5, ORM1, PDIA3), both predicted as secreted proteins (with Signal-p and no TM) and found in the BPA, were included in our list of candidate biomarkers for meat beef tenderness. Thus, these results allowed to enrich, to 75 candidate plasma proteins, the list of candidates proposed in this study. The relevance of the list is supported by the good overview of tenderness mechanisms permitted by the data, as illustrated by GO term enrichment and their semantic analysis. The main pathways involved in meat tenderness (reviewed in [21,33]) were detected with our dataset as illustrated by the top 50 BP terms retrieved by a GO analysis (Table 3). Indeed, we report Biological Processes related to muscle structure and contraction (protein stabilization, muscle contraction and development, chaperone-mediated protein complex assembly, cell adhesion), muscle energy metabolism (gluconeogenesis, glycolytic process, oxidation-reduction process, carbohydrate metabolism), "post-mortem proteolysis" (aging, apoptotic process), "oxidative stress and HSP proteins" (cell detoxification, response to hydrogen peroxide, response to oxidative stress), and "metabolism, transport and cell signalling" (protein

folding). The validation of the relevance of the aggregated dataset was a critical step prior to further computational analysis.

3.2. Reconstruction of the Secretome Linked to Tenderness and Identification of Secreted Proteins in Plasma

We propose for the first time a repertoire of secreted proteins related to tenderness. As predicted by bioinformatics, these proteins could be secreted through different pathways.

3.2.1. Proteins Predicted to Be Secreted through Conventional and Unconventional Pathways of Secretion (UPS)

From the aggregated dataset, 11.5 % of the proteins were predicted as secreted proteins through conventional- and 7.7% through alternative pathways. This is consistent with the report that 10–15 % of the human proteome is likely to be secreted through conventional and UPS secretory pathways [69,70]. However, although the bioinformatics reconstruction of the secretome with ProteINSIDE could identify secreted protein thanks to prediction algorithms, it did not enable to distinguish between proteins secreted into the surrounded extracellular fluid and proteins secreted into the bloodstream [67] Noteworthy, by overlapping the repertoire of predicted secreted proteins with a curated non-exhaustive bovine plasma atlas, we depicted 24% of them as putative plasma proteins. This result fits with the report by [71] that 31% of the secreted proteins of the human proteome are found in the plasma. However, the lower proportion of the secreted proteins in plasma in our dataset may be explained by the fact that our plasma atlas was very less that the 10,000 human proteins detected in serum/plasma curated from >500 published studies [70]. This suggests that by using a more complete plasma bovine atlas, we would increase by many the repertoire of secreted proteins in plasma. The semantic analysis of the enriched GO Biological Process associated with the repertoire of predicted secreted proteins in plasma (Table 4) revealed 6 associated biological pathways, linked to "cell adhesion", "apoptotic process", "endocytosis", "response to oxidative stress", "hydrogen peroxide metabolism", and "lipid metabolism". The most canonical pathways associated with the repertoire of 44 proteins were "homeostasis", "signal transduction (receptor tyrosine kinase signaling, and NR1H2/H3 mediated signaling)", "immune system (neutrophil degranulation)" and "transport of small molecules (plasma lipoprotein assembly, remodeling, ABC transporter ion channel, mitochondrial calcium ion transport . . .). These results are in accordance with the literature relating to mechanism involved in non-vesicular UPS secretion [72]; such as "ABC transporter" reported as involved in the maintain of a stable physiological state and homeostasis in vertebrates [73]. Also, the liver X receptors LXR-α (NR1H3) and LXR-β (NR1H2), a subclass of nuclear receptors, were reported to bind the oxidized forms of cholesterol (or oxysterols), and activate the target gene expression [74]. These observations, suggest that lipid metabolism [75] and by consequence, in the light of our results, the secretion of proteins associated with lipid metabolism (conventional and UPS), could be involved in the tenderness. This is consistent with previous studies linking the lipid metabolism with the meat quality attributes flavour and tenderness [76,77].

3.2.2. Proteins Hypothetically Secreted in the Plasma

By overlapping the repertoire of proteins not hallmarked for secretion (i.e., without a signal P, Target P, or a GO term "secretion") with the bovine protein atlas, we retrieved proteins known to be found in the plasma. We therefore declared them as proteins hypothetically secreted in the plasma. The biological processes associated with these proteins were associated mainly with muscle contraction, protein stabilization, protein folding, chaperones, carbohydrate metabolism, and endocytosis. Moreover, six BP terms (four related to oxidant status, one to neutrophil degranulation and one to receptor-mediated endocytosis) were shared between the repertoire of secreted proteins in plasma and of hypothetically secreted proteins in plasma. While anti-oxidant proteins (PRDX6, MPO, and ATP2A2) were rather associated with the predicted proteins secreted the former, heat-shock proteins (HSPA1A, HSPA1B, HSP90AA1) were associated with the proteins hypothetically secreted in plasma. The most canonical pathways associated with the repertoire of 13 proteins included "cell-cell

communication", "homeostasis", "muscle contraction", "metabolism of proteins", "metabolism of lipids (citric acid cycle and carbohydrate metabolism)", "programmed cell death", "cellular responses to external stimuli", "organelle biogenesis and maintenance (cilium assembly)", "autophagy", "extracellular matrix organization". Interestingly the primary cilia were described as involved in various pathways related to development and tissue homeostasis, such as *Wnt* [78] or *Hedgehog* [79] pathways. The muscle stem cells need a primary cilium for effective muscle regeneration [80]. The primary cilia were also reported as involved in other vesicular UPS [81].

3.3. Extracellular Vesicle Proteins as a Sub Repertoire of Tenderness Proteins Secreted in Plasma

During the last decade, extracellular vesicles (EVs) released by the cells have been described as key actors in intercellular communication in physiological conditions (e.g., heart and muscle development, angiogenesis) [82,83] and in pathogenesis especially in cancer [84]. The EVs are lipid bilayer particles composed of a range of different lipids and proteins (especially phospholipids, cholesterol and tetraspanin proteins), that can carry proteins, RNA and DNA in their aqueous core. EVs include microvesicles (MVs; 100–1000 nm size) or exosomes (30–100 nm size) and apoptotic bodies (1-5 μm) transporting proteins, mRNA, miRNA and lipids in the extracellular medium of cells and putatively in plasma because according to [85,86] all the bio-fluids (e.g., blood, urine, salive, lymphe, milk) contain EVs. Extracellular vesicles represent a potential source for biomarker discovery and can be used for drug and vaccine delivery conditions [87]. EVs are be considered as integrators of tissue physiology and whole-body homeostasis [88,89] EVs secretion is induced in response to extracellular signals such as ATP, interleukins, depolarization, thrombin receptor activation or by cell stress [90,91] Exosome secretion meanwhile can be induced by stress condition, micronutrient starvation, infection or cancer [92]. Recent studies have shown that skeletal muscle is also able to release EVs into the extracellular space [93,94] and to crosstalk with tissues and organs through this mechanism. In this study, we looked whether the hypothetically secreted proteins in plasma could be mapped to EVs. Supporting this hypothesis, we found that 36 % of the proteins were found in an atlas of vesicular proteins and 11 % in the exosome atlas. Therefore, we propose for the first time that EVs and exosome may be a possible reservoir of biomarkers for tenderness. We have identified 13 EVs proteins and two exosomal proteins in the dataset of hypothetically secreted proteins in plasma. Unexpectedly, we also found three vesicular proteins and two exosomal proteins (including the GAPDH protein in common) in the dataset of conventionally and unconventionally secreted proteins in plasma. Similarly, [70] also reported that proteins containing signal peptides that are secreted by the ER-Golgi pathway are also detected in extracellular vesicles. They suggested an unknown mechanism of sorting secreted proteins into these vesicles. Chauhan et al. [95] showed that the GAPDH protein is trafficked to the plasma membrane to be released in the extracellular matrix without use of the classic endoplasmic-Golgi secretion pathway but exosomes and secretory lysosomes.

To our knowledge, the association of EVs or exosomes with tenderness has never been reported. The biological significance of EVs tenderness proteins is unknown but their circulating level in the bloodstream could be a signature of the meat potential of the animals. Regarding their role, recent studies have suggested a role for EVs for the sharing of metabolites and other material between cells or tissues. According to Stahl et al. [96], EVs could operate as "independent metabolic units" that shuttle important molecules (enzymes, metabolites) for muscle homeostasis. Thus, we cannot exclude a role for EVs in unfavorable conditions especially following death of the animal (anoxia, pH and calcium release. The acid environment in muscle fibres after the animal death could promote the release of exosomes by muscle cells [97]. By delivering enzymes and/or metabolites involved in the glycolytic metabolism (e.g., LDHB and PGK1) to muscle cells *post-mortem*, the exosomes could compensate the early stop of glycolytic flux (glycolysis) independently of glycogen availability. EVs could also modulate the redox metabolism (myeloperoxidase (MPO), Thioredoxin-dependent peroxide reductase (PRDX3)) or address some HSP to delivery sites where they could play a crucial role in protecting the cells following death. Indeed, some HSP proteins such as the HSP70 [98,99] were reported in

association with the membranes of EVs. More specifically, the HSP90 protein has been described as being exported via exosome vesicles [100,101].

Following network analysis we could include five new proteins found in plasma (CFL1, GC, PLEC, SLC4A1 and VCL) in the repertoire of tenderness hypothetically secreted proteins in plasma. These proteins have not been linked to tenderness so far, but at the exception of GC (vitamin D binding protein), they can be related to known pathways important for meat tenderization. The Cofilin 1, non-muscle (CFL1) is known to be involved in promoting actin polymerisation and organisation of actin filament, lipid metabolism, gene regulation and apoptosis [102]. This protein was also reported as associated with muscle lipid composition [103] Jia et al. [104] compared the *post-mortem* evolution of the proteome muscles differing in their tenderness (the *Longissimus thoracis* (tender) muscle and *Semitendinosus* (tougher) muscle). They reported a decrease in the levels of CFL1. The plectin (PLEC) and the vinculin (VCL) are two major structural components of the muscle cytoskeleton [105] located at the Z-discs [106]. These proteins are important proteins found in the costamere (which attaches myofibrils to the sarcolemma) that are essential for muscle fibre integrity and function (reviewed in [107]). Their proteolytic degradation *post mortem* leads to the disruption of the myofibrillar structure and to tenderisation of the meat. The SLC4A1 gene encodes the Cl^-/HCO3$^-$ anion exchanger 1, an acid loader that exchange one Cl^- into cells for onw HCO_3^- out of cells, and thus is involved in the regulation of intracellular pH, especially in erythrocytes and kidney cells [108].

Relevance of the Secreted Proteins in Plasma for Tenderness Biomarkers Studies

Thanks to the bioinformatics prediction, we identified 75 proteins related to tenderness putatively secreted in plasma, through conventional, UPS or other pathways including EVs and/or exosome. Consistently, we detected four of them (ACTB, ENO3, GAPDH and MYH7) as differential according to tenderness in a proteomic analysis of the plasma in beef heifers (Boudon, et al., submitted). Twenty-four of the 75 putative plasma proteins (ATP2A2, ACTC1, HBB, HSP90AA1, LAMC1, LDHA, LDHB, PPARG, PVALB, TPM1, CASP8AP2, ACTN1, CAT, CCNB2, CFL1, GSS, MAPK1, NEFL, PRKACB, PSMA7, USP8, YWHAB, YWHAZ and ZBTB21) were encoded by genes located in a bovine meat QTL (shear force or tenderness score). More specifically, six proteins (HSP90AA1, LDHA, LDHB, PPARG, CAT and ORM1) among the 23 putative EVs and/or exosomal proteins were encoded by genes located in a bovine QTL for shear force. Likewise, the 14 plasma proteins identified by network analysis (CASP8AP2, ACTN1, CAT, CCNB2, CFL1, GSS, MAPK1, NEFL, PRKACB, PSMA7, USP8, YWHAB, YWHAZ and ZBTB21) was located in a QTL for shear force and/or a QTL for tenderness score in cattle. Interestingly, CFL1 harbors SNPs in its locus related to beef muscle lipid composition [103] These features made these 33 proteins relevant to be explored as plasma biomarkers for meat tenderness (Table 6).

4. Materials and Methods

4.1. Data Origin and Literature Search Strategy

4.1.1. Review of the Literature

A computational workflow was created (Figure 1) to retrieve the data and aggregate them from available publications reporting meat tenderness. Briefly, we collected publications on meat tenderness by literature boolean operators: "meat OR beef AND tenderness AND biomarkers", "meat AND quality" and "muscle AND beef AND proteome (or "transcriptome", or "genetics") using MEDLINE (PubMed, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/), GOOGLE (Google Scholar, https://scholar.google.fr/) and CLAVIRATE (Web Of Science, https://clarivate.com/products/web-of-science/) analytics search until January 2018.

4.1.2. Parameters of Inclusion

All of the articles related to cattle meat tenderness were reviewed and curated based on the relevance and significance of the results. Only, molecular data related to the meat tenderness of *Bos taurus* and *Bos indicus* were conserved. Protein data could come from individual data. Only data with significant correlation of genetic polymorphism with tenderness, or differential abundances of transcripts or proteins according to tenderness as declared by the authors, were kept to build a meat tenderness aggregated dataset. A study associated with one GEO Dataset reporting transcriptomic data was analyzed with GEO2R (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/) that enabled to compare two groups of samples according to tenderness. The differentially abundant transcripts between tenderness groups were included in our study.

4.2. Aggregation of Collected Data

4.2.1. Data Extraction

The molecular data collected from proteomic, transcriptomic or genetic studies were extracted from the articles and aggregated as follows. The proteins identifiers (ID) or gene symbols were retrieved from tables in Portable Document Format (PDF) or from supplementary data files of the publications. Data were extracted with Tabula (www.tabula.technology, Last update 11 February 2017).

4.2.2. Protein Identifiers Standardization

Protein ID and gene symbols were converted into the corresponding Gene Name identifiers (GN), as unique identifiers by use of three tools: Retrieve/ID Mapping tool of the Uniprot database (The UniProt 24), the Protein Identifier Cross-Reference service 25 and/or the ProteCONVERT tool of the ProteINSIDE web interface 26. Last conversion from ID to GN in February 2018.

4.3. Gene Ontology

In order to identify biological pathways associated with the aggregated dataset, Gene Ontology (GO) analysis was performed with the ProteINSIDE webservice (http://www.proteinside.org) [109] The GO enrichment analyses were achieved in the Human species in order to extend and promote GO interpretations because the bovine annotations remain limited. Only the Biological Process (BP) were considered. The Benjamini Hochberg (BH) adjusted P-values were considered to establish lists of significant enriched pathways in each dataset as compared to the whole genome. The GO_BP overview was carried out only with annotations with p-values < 0.001, minimum of annotated proteins ≥ 2. A table of the GO_BP overview was constructed in a semantic SimRel similarity-based Scatterplots with p-values associated to GO terms using REVIGO web tool (http://revigo.irb.hr/) [110] A visualization of the canonical pathways associated with the lists of candidate plasma proteins identified in the study was performed using Reactome tools (https://reactome.org/; voronoi hierarchical representation).

4.4. Computational Prediction for the Plasma Secreted Proteins Identification

4.4.1. Prediction of the Secreted Proteins

In order to identify putatively secreted proteins belonging to the aggregated dataset, we used ProteINSIDE, a free web tool (http://www.proteinside.org) [109] that enables retrieving biological information from public databases in a single query. The secretion prediction module of ProteINSIDE runs a local version of SignalP 4.1. From the sequences of input ID proteins, it looks for signal peptide type sequences. The program also checks if proteins are related to a secretory function by looking for GO secretion annotation terms. The aggregated dataset was submitted to a computational prediction of proteins secreted using "custom analysis", "bovine species", "signal P" and "increase cleavage site sensitivity (D-cutoff 0.34)" parameters (version of Database 1.2.11, CBS signal-P 4.1 software, May 2018). To declare proteins as "predicted secreted proteins", we used the following criteria.

(1) File tab "Secreted Protein", Signal-P score > 0.5 and Target-P score ≤ 2 to identify the proteins predicted as secreted through a signal-P sequence and/or a transmembrane domain (TM) (named "conventional predicted secreted proteins"). (2) File tab "other secreted protein", Target-P score ≤ 3 with GO term associated to identify the proteins predicted as secreted through an unconventional pathway of secretion (or UPS) without signal-P (named "UPS predicted secreted proteins") [72,111]. The conventional- and UPS- predicted secreted proteins were merged in a single repertoire referred to as predicted secreted proteins. All of the proteins not identified as predicted secreted proteins were "the remaining proteins" (aggregated data minus secreted proteins).

4.4.2. Prediction of Plasma Location

In order to search for the proteins that may be found in the plasma, we compared protein lists using VIB / UGent (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/). The comparisons were performed between the repertoire of predicted secreted proteins and a "Bovine Plasma proteome Atlas" (BPA, n = 1101 plasma proteins, which were merged from publications [67] and experimental data (Supplementary Data 3). Similarly, a comparison between the remaining proteins and the BPA was performed to detect hypothetically secreted proteins and found in plasma.

4.5. Network Analysis and Protein-Protein Interactions

In order to enrich the list of putative plasma proteins, we used the academic Cytoscape open source software® (Version 3.7.2, https://cytoscape.org/) [112] with the Psicquic plugging web service (https://apps.cytoscape.org/apps/psicquicuniversalclient, up to date, 2017-12-17) [113]. The parameters for network analysis were "MINT database", "human species". The proteins that interact with proteins within our dataset were named "interactors". For representation, the 13 predicted secreted proteins in plasma (conventional and alternative pathways) are shown in purple ellipses. The 44 hypothetically secreted proteins in plasma are shown in pink ellipses. The green rectangle refer to interactor identify using the MINT Cytoscape analysis.

4.6. Search for QTL

By using the ProteQTL module of ProteINSIDE, we searched for the location of genes encoding the proteins of interest within published Quantitative trait loci (QTL) for tenderness.

4.7. Identification of the EVs Proteins

In order to test the hypothesis that membrane-derived vesicles secretion could be associated with tenderness, we compared the repertoires of candidate proteins with the Human Protein Atlas (HPA) that lists the vesicular proteins experimentally detected in the vesicles (referred to as "vesicular protein Atlas", n = 1998; 2019 October, 28th; https://www.proteinatlas.org/) and the Exosome protein atlas (n = 100, 25 October 2019, http://exocarta.org/) that lists the proteins detected in exosomes.

4.8. Dataset Descriptors

Four datasets were generated in this study. The aggregated dataset merged from three individual lists related to beef tenderness, namely a "proteomic dataset", a "transcriptomic dataset", and a "genetic dataset" The aggregated dataset (named "full compiled atlas") was deposited as ".xls" files at the French INRA public repository (Portail Data INRA, data.inra.fr) hosted by Dataverse.org and is directly available at [63]. In addition, the two repertoires generated by reconstruction of the secretome were named the "predicted secreted proteins in plasma" and the "proteins hypothetically secreted in plasma". Finally, the merged of the "predicted secreted proteins in plasma", the "proteins hypothetically secreted in plasma" and the "interactors" putatively found in the plasma" generated the final list of candidate plasma proteins proposed by this study as putative low-invasive candidates for meat tenderness in beef cattle.

5. Conclusions

This study is the first to use data aggregated from a corpus of published data for the purpose of identifying novel meat tenderness in muscle (thanks to PPi) and in the plasma. We propose for the first time a non-exhaustive list of 75 candidate biomarkers for tenderness in the plasma. Combined with QTL data and recent literature, 33 are of particular interest for further evaluation and validation for future low-invasive approach, among which four proteins recently reported as muscle tenderness biomarkers and found in plasma. Another original finding of this study is that the secretion pathway of 13 of these plasma proteins could be the membrane-derived vesicle secretion. The 33 plasma candidate biomarkers for meat tenderness identified in this study require further assessment and validation.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at http://www.mdpi.com/1422-0067/21/2/664/s1; Supplementary Data 1. Reactome representation of the canonical pathways associated with the 13 "predicted secreted proteins in plasma" identified in this study; Supplementary Data 2. Reactome representation of the canonical pathways associated with the 44 "hypothetically secreted proteins in plasma" identified in this study; Supplementary Data 3. List of the 1101 Gene Names used as Bovine Proteome Atlas (BPA).

Author Contributions: S.B., I.C.-M. and J.H.-B. defined the experiment design, managed the experiment, co-wrote the paper, and approved the final draft of the manuscript. S.B. performed the literature review, aggregation of data and the computational analyses, managed the data, and prepared figures and/or tables. All authors collaborated to interpretation and discussion of the results. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Funding: This research was funded by "the regional council of Auvergne Rhône-Alpes (France)" and the "FEDER (Ressourcement S3, Europe)".

Acknowledgments: The authors acknowledge Brigitte Picard, Isabelle Ortigues-Marty, and Mylène Delosière for helpful discussions during the preparation of the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

BP	Biological process
BPA	Bovine proteome atlas
EVs	Extracellular vesicles
GN	Gene name
GO	Gene ontology
HPA	Human protein atlas
ID	Identifiers
PPi	Protein-protein interaction
QTL	Quantitative trait loci
UPS	Unconventional pathways of secretion

References

1. Gerber, P.J.; Mottet, A.; Opio, C.I.; Falcucci, A.; Teillard, F. Environmental impacts of beef production: Review of challenges and perspectives for durability. *Meat Sci.* **2015**, *109*, 2–12. [CrossRef] [PubMed]
2. O'Quinn, T.G.; Legako, J.F.; Brooks, J.C.; Miller, M.F. Evaluation of the contribution of tenderness, juiciness, and flavor to the overall consumer beef eating experience1. *Transl. Anim. Sci.* **2018**, *2*, 26–36. [CrossRef]
3. Gagaoua, M.; Terlouw, C.; Micol, D.; Boudjellal, A.; Hocquette, J.-F.; Picard, B. Proteomic Biomarkers of Meat Colour of Blonde D'Aquitaine Young Bulls: Towards a Better Comprehension of the Biological Mechanisms, 61th Int. Congr. Meat Sci. Technol. (ICoMST). In Proceedings of the 61st International Congress of Meat Science and Meat Technology, Clermont-Ferrand, France, 23–28 August 2015; p. 93. Available online: http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=FR2016209911 (accessed on 31 October 2019).
4. McCormick, C. *Applied Muscle Biology and Meat Science*; Du, M., McCormick, R.J., Eds.; CRC Press: New York, NY, USA, 2009; pp. 128–148.
5. Dransfield, E.; Martin, J.-F.; Bauchart, D.; Abouelkaram, S.; Lepetit, J.; Culioli, J.; Jurie, C.; Picard, B. Meat quality and composition of three muscles from French cull cows and young bulls. *Anim. Sci.* **2003**, *76*, 387–399. [CrossRef]

6. Sinclair, K.D.; Lobley, G.E.; Horgan, G.W.; Kyle, D.J.; Porter, A.D.; Matthews, K.R.; Warkup, C.C.; Maltin, C.A. Factors influencing beef eating quality 1. Effects of nutritional regimen and genotype on organoleptic properties and instrumental texture. *Anim. Sci.* **2001**, *72*, 269–277. [CrossRef]
7. Hansen, S.; Therkildsen, M.; Byrne, D.V. Effects of a compensatory growth strategy on sensory and physical properties of meat from young bulls. *Meat Sci.* **2006**, *74*, 628–643. [CrossRef]
8. Soulat, J.; Picard, B.; Léger, S.; Monteils, V. Prediction of beef carcass and meat quality traits from factors characterising the rearing management system applied during the whole life of heifers. *Meat Sci.* **2018**, *140*, 88–100. [CrossRef]
9. Gagaoua, M.; Picard, B.; Soulat, J.; Monteils, V. Clustering of sensory eating qualities of beef: Consistencies and differences within carcass, muscle, animal characteristics and rearing factors. *Livest. Sci.* **2018**, *214*, 245–258. [CrossRef]
10. Terlouw, C. Stress Reactivity, Stress at Slaughter and Meat Quality. In *Meat Quality: Genetic and Environmental Factors*; CRC Press: New York, NY, USA, 2015; p. 105. Available online: http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=LV2016025540 (accessed on 22 October 2019).
11. Ouali, A. Sensory quality of meat as affected by muscle biochemistry and modern technologies. In *Animal Biotechnology and the Quality of Meat Production*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1991; pp. 85–105. [CrossRef]
12. Shackelford, S.D.; Wheeler, T.L.; Koohmaraie, M. Tenderness classification of beef: I. Evaluation of beef longissimus shear force at 1 or 2 days postmortem as a predictor of aged beef tenderness. *J. Anim. Sci.* **1997**, *75*, 2417–2422. [CrossRef]
13. Miller, R.K. The Eating Quality of Meat: V-Sensory Evaluation of Meat. In *Lawrie´ s Meat Science*, 8th ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2017; pp. 461–499. [CrossRef]
14. Sensory and Tenderness Evaluation Guidelines, (n.d.). Available online: https://meatscience.org/publications-resources/printed-publications/sensory-and-tenderness-evaluation-guidelines (accessed on 15 January 2020).
15. 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. [CrossRef]
16. Taye, M.; Kim, J.; Yoon, S.H.; Lee, W.; Hanotte, O.; Dessie, T.; Kemp, S.; Mwai, O.A.; Caetano-Anolles, K.; Cho, S.; et al. Whole genome scan reveals the genetic signature of African Ankole cattle breed and potential for higher quality beef. *BMC Genet.* **2017**, *18*, 11. [CrossRef]
17. Bernard, C.; Cassar-Malek, I.; le Cunff, M.; Dubroeucq, H.; Renand, G.; Hocquette, J.F. New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 5229–5237. [CrossRef] [PubMed]
18. Hocquette, J.-F.; Bernard-Capel, C.; Vidal, V.; Jesson, B.; Levéziel, H.; Renand, G.; Cassar-Malek, I. The GENOTEND chip: A new tool to analyse gene expression in muscles of beef cattle for beef quality prediction. *BMC Vet. Res.* **2012**, *8*, 135. [CrossRef] [PubMed]
19. Lametsch, R.; Karlsson, A.; Rosenvold, K.; Andersen, H.J.; Roepstorff, P.; Bendixen, E. Postmortem Proteome Changes of Porcine Muscle Related to Tenderness. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6992–6997. Available online: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf034083p (accessed on 2 March 2017). [CrossRef] [PubMed]
20. Przybylski, W.; Hopkins, D. *Meat Quality: Genetic and Environmental Factors*; Przybylski, W., Hopkins, D., Eds.; CRC Press: New York, NY, USA, 2015.
21. Picard, B.; Gagaoua, M. Proteomic Investigations of Beef Tenderness. *Proteom. Food Sci.* **2017**, 177–197. [CrossRef]
22. Gagaoua, M.; Terlouw, E.M.C.; Micol, D.; Hocquette, J.-F.; Moloney, A.P.; Nuernberg, K.; Bauchart, D.; Boudjellal, A.; Scollan, N.D.; Richardson, R.I.; et al. Sensory quality of meat from eight different types of cattle in relation with their biochemical characteristics. *J. Integr. Agric.* **2016**, *15*, 1550–1563. [CrossRef]
23. Picard, B.; Gagaoua, M.; Micol, D.; Cassar-Malek, I.; Hocquette, J.-F.; Terlouw, C.E.M. Inverse Relationships between Biomarkers and Beef Tenderness According to Contractile and Metabolic Properties of the Muscle. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 9808–9818. [CrossRef]
24. Cassar-Malek, I.; Picard, B. Expression Marker-Based Strategy to Improve Beef Quality. *Sci. World J.* **2016**, *2016*, 1–11. [CrossRef]
25. Jia, X.; Veiseth-Kent, E.; Grove, H.; Kuziora, P.; Aass, L.; Hildrum, K.I.; Hollung, K. Peroxiredoxin-6 A potential protein marker for meat tenderness in bovine longissimus thoracis muscle. *J. Anim. Sci.* **2009**, *87*, 2391–2399; [CrossRef]

26. Kim, G.-D.; Yang, H.-S.; Jeong, J.-Y. Comparison of Characteristics of Myosin Heavy Chain-based Fiber and Meat Quality among Four Bovine Skeletal Muscles. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* **2016**, *36*, 819–828. [CrossRef]
27. Lana, A.; Longo, V.; Dalmasso, A.; D'Alessandro, A.; Bottero, M.T.; Zolla, L. Omics integrating physical techniques: Aged Piedmontese meat analysis. *Food Chem.* **2015**, *172*, 731–741. [CrossRef]
28. Laville, E.; Sayd, T.; Morzel, M.; Blinet, S.; Chambon, C.; Lepetit, J.; Renand, G.; Hocquette, J.F.F. Proteome changes during meat aging in tough and tender beef suggest the importance of apoptosis and protein solubility for beef aging and tenderization. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 10755–10764. [CrossRef] [PubMed]
29. Picard, B.; Guillemin, N.; Bonnet, M.; Champanelle, S.G.; Cassar-Malek, I.; Guillemin, N.; Bonnet, M. 4.32-Quest for Novel Muscle Pathway Biomarkers by Proteomics in Beef Production. *Compr. Biotechnol.* **2011**, *1*, 395–405. [CrossRef]
30. Thornton, K.J.; Chapalamadugu, K.C.; Eldredge, E.M.; Murdoch, G.K. Analysis of Longissimus thoracis Protein Expression Associated with Variation in Carcass Quality Grade and Marbling of Beef Cattle Raised in the Pacific Northwestern United States. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 1434–1442. [CrossRef] [PubMed]
31. Bowker, B.C.; Eastridge, J.S.; Solomon, M.B. Measurement of Muscle Exudate Protein Composition as an Indicator of Beef Tenderness. *J. Food Sci.* **2014**, *79*, C1292–C1297. [CrossRef] [PubMed]
32. Zhao, C.; Zan, L.; Wang, Y.; Updike, M.S.; Liu, G.; Bequette, B.J.; Vi, R.L.B.; Song, J. Functional proteomic and interactome analysis of proteins associated with beef tenderness in Angus cattle. *Livest. Sci.* **2014**, *161*, 201–209. [CrossRef]
33. D'Alessandro, A.; Rinalducci, S.; Marrocco, C.; Zolla, V.; Napolitano, F.; Zolla, L. Love me tender: An Omics window on the bovine meat tenderness network. *J. Proteom.* **2012**, *75*, 4360–4380. [CrossRef]
34. 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. [CrossRef]
35. 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. Proteins in longissimus muscle of Korean native cattle and their relationship to meat quality. *Meat Sci.* **2008**, *80*, 1068–1073. [CrossRef]
36. 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. [CrossRef]
37. Bjarnadottir, S.G.; Hollung, K.; Høy, M.; Bendixen, E.; Codrea, M.C.; Veiseth-Kent, E. 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.* **2012**, *90*, 2035–2043. [CrossRef]
38. Carvalho, M.E.; Gasparin, G.; Poleti, M.D.; Rosa, A.F.; Balieiro, J.C.C.; Labate, C.A.; Nassu, R.T.; Tullio, R.R.; Regitano, L.C.D.; Mourão, G.B.; et al. Heat shock and structural proteins associated with meat tenderness in Nellore beef cattle, a Bos indicus breed. *Meat Sci.* **2014**, *96*, 1318–1324. [CrossRef] [PubMed]
39. Chaze, T.; Hocquette, J.-F.; Meunier, B.; Renand, G.; Jurie, C.; Chambon, C.; Journaux, L.; Rousset, S.; Denoyelle, C.; Lepetit, J.; et al. Biological Markers for Meat Tenderness of the Three Main French Beef Breeds Using 2-DE and MS Approach. In *Proteomics in Foods*; Springer US: Boston, MA, USA, 2013; pp. 127–146. [CrossRef]
40. Guillemin, N.P.; 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. [CrossRef]
41. Guillemin, 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*, 91–97. Available online: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19996488 (accessed on 23 October 2019). [PubMed]
42. Baldassini, W.A.; Braga, C.P.; Chardulo, L.A.L.; Silva, J.A.I.V.; Malheiros, J.M.; de Albuquerque, L.G.; Fernandes, T.T.; Padilha, P.d. 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 Chem.* **2015**, *169*, 65–72. [CrossRef]

43. Boudida, Y.; Gagaoua, M.; 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.* **2016**, *56*, 957–972. [CrossRef]
44. Chulayo, A.Y.; Bradley, G.; Muchenje, V. Effects of transport distance, lairage time and stunning efficiency on cortisol, glucose, HSPA1A and how they relate with meat quality in cattle. *Meat Sci.* **2016**, *117*, 89–96. [CrossRef]
45. Franco, D.; Mato, A.; Salgado, F.J.; López-Pedrouso, M.; Carrera, M.; Bravo, S.; Parrado, M.; Gallardo, J.M.; Zapata, C. Tackling proteome changes in the longissimus thoracis bovine muscle in response to pre-slaughter stress. *J. Proteom.* **2015**, *122*, 73–85. [CrossRef]
46. Grabež, V.; Kathri, M.; Phung, V.; Moe, K.M.; Slinde, E.; Skaugen, M.; Saarem, K.; Egelandsdal, B. Protein expression and oxygen consumption rate of early postmortem mitochondria relate to meat tenderness. *J. Anim. Sci.* **2015**, *93*, 1967–1979. [CrossRef]
47. Guillemin, 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. [CrossRef]
48. Fonseca, L.F.S.; Gimenez, D.F.J.; dos Santos Silva, D.B.; Barthelson, R.; Baldi, F.; Ferro, J.A.; Albuquerque, L.G. Differences in global gene expression in muscle tissue of Nellore cattle with divergent meat tenderness. *BMC Genom.* **2017**, *18*, 945. [CrossRef]
49. Kee, H.J.; Park, E.W.; Lee, C.K. Characterization of beef transcripts correlated with tenderness and moisture. *Mol. Cells* **2008**, *25*, 428–437. [PubMed]
50. Bongiorni, S.; Gruber, C.E.M.; Bueno, S.; Chillemi, G.; Ferre, F.; Failla, S.; Moioli, B.; Valentini, A. Transcriptomic investigation of meat tenderness in two Italian cattle breeds. *Anim. Genet.* **2016**, *47*, 273–287. [CrossRef] [PubMed]
51. Zhang, X.H.; Qi, Y.X.; Gao, X.; Li, J.Y.; Xu, S.Z. Expression of ADAMTS4 and ADAMTS5 in longissimus dorsi muscle related to meat tenderness in Nanyang cattle. *Genet. Mol. Res.* **2013**, *12*, 4639–4647. [CrossRef] [PubMed]
52. Zhao, C.; Tian, F.; Yu, Y.; Luo, J.; Hu, Q.; Bequette, B.J.; Vi, R.L.B.; Liu, G.; Zan, L.; Updike, M.S.; et al. Muscle transcriptomic analyses in Angus cattle with divergent tenderness. *Mol. Biol. Rep.* **2012**, *39*, 4185–4193. [CrossRef] [PubMed]
53. Malheiros, J.M.; Enríquez-Valencia, C.E.; da Silva Duran, B.O.; de Paula, T.G.; Curi, R.A.; de Vasconcelos Silva, J.A.I.; Dal-Pai-Silva, M.; de Oliveira, H.N.; Chardulo, L.A.L. Association of CAST2, HSP90AA1, DNAJA1 and HSPB1 genes with meat tenderness in Nellore cattle. *Meat Sci.* **2018**, *138*, 49–52. [CrossRef] [PubMed]
54. Gurgul, A.; Szmatoła, T.; Ropka-Molik, K.; Jasielczuk, I.; Pawlina, K.; Semik, E.; Bugno-Poniewierska, M. Identification of genome-wide selection signatures in the Limousin beef cattle breed. *J. Anim. Breed. Genet.* **2016**, *133*, 264–276. [CrossRef] [PubMed]
55. Hou, G.-Y.; Yuan, Z.-R.; Gao, X.; Li, J.-Y.; Gao, H.-J.; Chen, J.-B.; Xu, S.-Z. Genetic Polymorphisms of the CACNA2D1 Gene and Their Association with Carcass and Meat Quality Traits in Cattle. *Biochem. Genet.* **2010**, *48*, 751–759. [CrossRef]
56. Pinto, L.F.; Ferraz, J.B.; Pedrosa, V.B.; Eler, J.P.; Meirelles, F.V.; Bonin, M.D.N.; Rezende, F.M.D.; Carvalho, M.E.; Cucco, D.D.C.; Silva, R.C. Single nucleotide polymorphisms in CAPN and leptin genes associated with meat color and tenderness in Nellore cattle. *Genet. Mol. Res.* **2011**, *10*, 2057–2064. [CrossRef]
57. Ramayo-Caldas, Y.; Renand, G.; Ballester, M.; Saintilan, R.; Rocha, D. Multi-breed and multi-trait co-association analysis of meat tenderness and other meat quality traits in three French beef cattle breeds. Genet. *Sel. Evol.* **2016**, *48*, 37. [CrossRef]
58. Fan, Y.Y.; Zan, L.S.; Fu, C.Z.; Tian, W.Q.; Wang, H.B.; Liu, Y.Y.; Xin, Y.P. Three novel SNPs in the coding region of PPARγ gene and their associations with meat quality traits in cattle. *Mol. Biol. Rep.* **2011**, *38*, 131–137. [CrossRef]
59. Allais, S.; Journaux, L.; Levéziel, H.; Payet-Duprat, N.; Raynaud, P.; Hocquette, J.F.; Lepetit, J.; Rousset, S.; Denoyelle, C.; Bernard-Capel, C.; et al. Effects of polymorphisms in the calpastatin and μ-calpain genes on meat tenderness in 3 French beef breeds. *J. Anim. Sci.* **2011**, *89*, 1–11. [CrossRef] [PubMed]

60. Avilés, C.; Peña, F.; Polvillo, O.; Barahona, M.; Campo, M.M.; Sañudo, C.; Juárez, M.; Horcada, A.; Alcalde, M.J.; Molina, A. Association between functional candidate genes and organoleptic meat traits in intensively-fed beef. *Meat Sci.* **2015**, *107*, 33–38. [CrossRef] [PubMed]
61. Gui, L.; Wang, H.; Wei, S.; Zhang, Y.; Zan, L. Molecular characterization, expression profiles, and analysis of Qinchuan cattle SIRT1 gene association with meat quality and body measurement traits (Bos taurus). *Mol. Biol. Rep.* **2014**, *41*, 5237–5246. [CrossRef] [PubMed]
62. Rexroad Iii, C.E.; Bennett, G.L.; Stone, R.T.; Keele, J.W.; Fahrenkrug, S.C.; Freking, B.A.; Kappes, S.M.; Smith, T.P. Comparative mapping of BTA15 and HSA11 including a region containing a QTL for meat tenderness. *Mamm. Genome* **2001**, *12*, 561–565. [CrossRef] [PubMed]
63. Tizioto, P.C.; Decker, J.E.; Taylor, J.F.; Schnabel, R.D.; Mudadu, M.A.; Silva, F.L.; Mourão, G.B.; Coutinho, L.L.; Tholon, P.; Sonstegard, T.S.; et al. Genome scan for meat quality traits in Nelore beef cattle. *Physiol. Genom.* **2013**, *45*, 1012–1020. [CrossRef] [PubMed]
64. Boudon, S.; Cassar-Malek, I. Dataset of Proteins Related to Beef Tenderness. Portail Data INRAE, V1. 2019. Available online: https://doi.org/10.15454/7DKRQD (accessed on 16 January 2020).
65. Stastna, M.; van Eyk, J.E. Secreted proteins as a fundamental source for biomarker discovery. *Proteomics* **2012**, *12*, 722–735. [CrossRef]
66. Rifai, N.; Gillette, M.A.; Carr, S.A. Protein biomarker discovery and validation: The long and uncertain path to clinical utility. *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 971–983. [CrossRef]
67. Bonnet, M.; Tournayre, J.; Cassar-Malek, I. Integrated data mining of transcriptomic and proteomic datasets to predict the secretome of adipose tissue and muscle in ruminants. *Mol. Biosyst.* **2016**, *12*, 2722–2734. [CrossRef]
68. Picard, B.; Gagaoua, M. Meta-proteomics for the discovery of protein biomarkers of beef tenderness: An overview of integrated studies. *Food Res. Int.* **2020**, *127*, 108739. [CrossRef]
69. Caccia, D.; Dugo, M.; Callari, M.; Bongarzone, I. Bioinformatics tools for secretome analysis. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* **2013**, *1834*, 2442–2453. [CrossRef]
70. Keerthikumar, S. A catalogue of human secreted proteins and its implications. *AIMS Biophys.* **2016**, *3*, 563–570. [CrossRef]
71. Uhlén, M.; Fagerberg, L.; Hallström, B.M.; Lindskog, C.; Oksvold, P.; Mardinoglu, A.; Sivertsson, Å.; Kampf, C.; Sjöstedt, E.; Asplund, A.; et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science* **2015**, *347*, 1260419. [CrossRef] [PubMed]
72. Rabouille, C. Pathways of Unconventional Protein Secretion. *Trends Cell Biol.* **2017**, *27*, 230–240. [CrossRef] [PubMed]
73. Dean, M.; Annilo, T. Evolution of the Atp-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily in Vertebrates. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* **2005**, *6*, 123–142. [CrossRef] [PubMed]
74. Repa, J.J.; Mangelsdorf, D.J. The Role of Orphan Nuclear Receptors in the Regulation of Cholesterol Homeostasis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2000**, *16*, 459–481. [CrossRef] [PubMed]
75. Robelin, J.; Casteilla, L. Différenciation, croissance et développement du tissu adipeux. *Prod. Anim.* **1990**, *3*, 243–252. Available online: http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:d?veloppement+du+tissu+adipeux#0 (accessed on 17 January 2020).
76. Picard, B.; Jurie, C.; Duris, M.P.; Renand, G. Consequences of selection for higher growth rate on muscle fibre development in cattle. *Livest. Sci.* **2006**, *102*, 107–120. [CrossRef]
77. Bonny, S.P.F.; Gardner, G.E.; Pethick, D.W.; Legrand, I.; Polkinghorne, R.J.; Hocquette, J.F. Biochemical measurements of beef are a good predictor of untrained consumer sensory scores across muscles. *Animal* **2015**, *9*, 179–190. [CrossRef]
78. Wallingford, J.B.; Mitchell, B. Strange as it may seem: The many links between Wnt signaling, planar cell polarity, and cilia. *Genes Dev.* **2011**, *25*, 201–213. [CrossRef]
79. Satir, P.; Pedersen, L.B.; Christensen, S.T. The primary cilium at a glance. *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 499–503. [CrossRef]
80. Marican, N.H.J.; Cruz-Migoni, S.B.; Borycki, A.G. Asymmetric distribution of primary cilia allocates satellite cells for self-renewal. *Stem Cell Rep.* **2016**, *6*, 798–805. [CrossRef] [PubMed]
81. Tian, G.; Ropelewski, P.; Nemet, I.; Lee, R.; Lodowski, K.H.; Imanishi, Y. An unconventional secretory pathway mediates the cilia targeting of peripherin/rds. *J. Neurosci.* **2014**, *34*, 992–1006. [CrossRef]

82. Ribeiro, M.F.; Zhu, H.; Millard, R.W.; Fan, G.-C. Exosomes Function in Pro- and Anti-Angiogenesis. *Curr. Angiogenes.* **2013**, *2*, 54–59. [CrossRef] [PubMed]
83. Meldolesi, J. Exosomes and Ectosomes in Intercellular Communication. *Curr. Biol.* **2018**, *28*, R435–R444. [CrossRef] [PubMed]
84. Kharaziha, P.; Ceder, S.; Li, Q.; Panaretakis, T. Tumor cell-derived exosomes: A message in a bottle. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **2012**, *1826*, 103–111. [CrossRef] [PubMed]
85. Raposo, G.; Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* **2013**, *200*, 373–383. [CrossRef] [PubMed]
86. Yáñez-Mó, M.; Siljander, P.R.M.; Andreu, Z.; Bedina Zavec, A.; Borràs, F.E.; Buzas, E.I.; Buzas, K.; Casal, E.; Cappello, F.; Carvalho, J.; et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. Vesicles* **2015**, *4*, 27066. [CrossRef]
87. Vasconcelos, M.H.; Caires, H.R.; Ābols, A.; Xavier, C.P.R.; Linē, A. Extracellular vesicles as a novel source of biomarkers in liquid biopsies for monitoring cancer progression and drug resistance. *Drug Resist. Updates* **2019**, *47*, 100647. [CrossRef]
88. Romancino, D.P.; Paterniti, G.; Campos, Y.; de Luca, A.; di Felice, V.; d'Azzo, A.; Bongiovanni, A. Identification and characterization of the nano-sized vesicles released by muscle cells. *FEBS Lett.* **2013**, *587*, 1379–1384. [CrossRef]
89. Forterre, A.; Jalabert, A.; Berger, E.; Baudet, M.; Chikh, K.; Errazuriz, E.; De Larichaudy, J.; Chanon, S.; Weiss-Gayet, M.; Hesse, A.M.; et al. Proteomic Analysis of C2C12 Myoblast and Myotube Exosome-Like Vesicles: A New Paradigm for Myoblast-Myotube Cross Talk? *PLoS ONE* **2014**, *9*, e84153. [CrossRef]
90. 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. The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 9103–9108. [CrossRef] [PubMed]
91. Eldh, M.; Ekström, K.; Valadi, H.; Sjöstrand, M.; Olsson, B.; Jernås, M.; Lötvall, J. Exosomes Communicate Protective Messages during Oxidative Stress; Possible Role of Exosomal Shuttle RNA. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e15353. [CrossRef] [PubMed]
92. Cruz-Garcia, D.; Curwin, A.J.; Popoff, J.-F.; Bruns, C.; Duran, J.M.; Malhotra, V. Remodeling of secretory compartments creates CUPS during nutrient starvation. *J. Cell Biol.* **2014**, *207*, 695–703. [CrossRef] [PubMed]
93. Rome, S.; Forterre, A.; Mizgier, M.L.; Bouzakri, K. Skeletal Muscle-Released Extracellular Vesicles: State of the Art. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 929. [CrossRef]
94. Le Bihan, M.C.; Bigot, A.; Jensen, S.S.; Dennis, J.L.; Rogowska-Wrzesinska, A.; Lainé, J.; Gache, V.; Furling, D.; Jensen, O.N.; Voit, T.; et al. In-depth analysis of the secretome identifies three major independent secretory pathways in differentiating human myoblasts. *J. Proteom.* **2012**, *77*, 344–356. [CrossRef]
95. Chauhan, S.S.; England, E.M. Postmortem glycolysis and glycogenolysis: Insights from species comparisons. *Meat Sci.* **2018**, *144*, 118–126. [CrossRef]
96. Stahl, P.D.; Raposo, G. Extracellular Vesicles: Exosomes and Microvesicles, Integrators of Homeostasis. *Physiology (Bethesda)* **2019**, *34*, 169–177. [CrossRef]
97. Parolini, I.; Federici, C.; Raggi, C.; Lugini, L.; Palleschi, S.; De Milito, A.; Coscia, C.; Iessi, E.; Logozzi, M.; Molinari, A.; et al. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 34211–34222. [CrossRef]
98. Vega, V.L.; Rodríguez-Silva, M.; Frey, T.; Gehrmann, M.; Diaz, J.C.; Steinem, C.; Multhoff, G.; Arispe, N.; De Maio, A. Hsp70 Translocates into the Plasma Membrane after Stress and Is Released into the Extracellular Environment in a Membrane-Associated Form that Activates Macrophages. *J. Immunol.* **2008**, *180*, 4299–4307. [CrossRef]
99. Gastpar, R.; Gehrmann, M.; Bausero, M.A.; Asea, A.; Gross, C.; Schroeder, J.A.; Multhoff, G. Heat Shock Protein 70 Surface-Positive Tumor Exosomes Stimulate Migratory and Cytolytic Activity of Natural Killer Cells. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 5238–5247. [CrossRef]
100. Clayton, A.; Turkes, A.; Navabi, H.; Mason, M.D.; Tabi, Z. Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes. *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 3631–3638. [CrossRef] [PubMed]
101. McCready, J.; Sims, J.D.; Chan, D.; Jay, D.G. Secretion of extracellular hsp90α via exosomes increases cancer cell motility: A role for plasminogen activation. *BMC Cancer* **2010**, *10*, 294. [CrossRef] [PubMed]

102. Bamburg, J.R.; Bernstein, B.W. Roles of ADF/cofilin in actin polymerization and beyond. *F1000 Biol. Rep.* **2010**, *2*, 62. [CrossRef] [PubMed]
103. Dunner, S.; Sevane, N.; Garcia, D.; Levéziel, H.; Williams, J.L.; Mangin, B.; Valentini, A. Genes involved in muscle lipid composition in 15 European Bos taurus breeds. *Anim. Genet.* **2013**, *44*, 493–501. [CrossRef]
104. Jia, X.; Hollung, K.; Therkildsen, M.; Hildrum, K.I.; Bendixen, E. Proteome analysis of early post-mortem changes in two bovine muscle types:M. longissimus dorsi andM. Semitendinosis. *Proteomics* **2006**, *6*, 936–944. [CrossRef]
105. Svitkina, T.M.; Verkhovsky, A.B.; Borisy, G.G. Plectin sidearms mediate interaction of intermediate filaments with microtubules and other components of the cytoskeleton. *J. Cell Biol.* **1996**, *135*, 991–1007. [CrossRef]
106. Zernig, G.; Wiche, G. Morphological integrity of single adult cardiac myocytes isolated by collagenase treatment: Immunolocalization of tubulin, microtubule-associated proteins 1 and 2, plectin, vimentin, and vinculin. *Eur. J. Cell Biol.* **1985**, *38*, 113–122. Available online: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2992982 (accessed on 14 November 2019).
107. Jaka, O.; Casas-Fraile, L.; de Munain, A.L.; Sáenz, A. Costamere proteins and their involvement in myopathic processes. *Expert Rev. Mol. Med.* **2015**, *17*, e12. [CrossRef]
108. Thornell, I.M.; Bevensee, M.O. Regulators of Slc4 bicarbonate transporter activity. *Front. Physiol.* **2015**, *6*, 166. [CrossRef]
109. Kaspric, N.; Picard, B.; Reichstadt, M.; Tournayre, J.; Bonnet, M. ProteINSIDE to easily investigate proteomics data from ruminants: Application to mine proteome of adipose and muscle tissues in bovine foetuses. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0128086. [CrossRef]
110. Supek, F.; Bošnjak, M.; Škunca, N.; Šmuc, T. REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e21800. [CrossRef] [PubMed]
111. Nickel, W.; Rabouille, C. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 148–155. [CrossRef] [PubMed]
112. Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N.S.; Wang, J.T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. Cytoscape: A software Environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* **2003**, *13*, 2498–2504. [CrossRef] [PubMed]
113. PSICQUIC Registry, (n.d.). Available online: http://www.ebi.ac.uk/Tools/webservices/psicquic/registry/registry?action=STATUS (accessed on 18 January 2020).

© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Points clés de la publication 1

- Une analyse *in-silico* de type « revue systématique de bases de données » (n=469 ID Gene Name) a permis d'identifier des protéines candidates dans le plasma grâce à une analyse bio-informatique du « sécrétome » en lien avec la tendreté de la viande bovine **(Tableau 7)**.
- Pour la première fois, 75 protéines plasmatiques sont proposées comme candidats biomarqueurs « peu-invasifs » qui, une fois validés, pourraient permettre d'évaluer la tendreté de la viande bovine. Parmi ces 75 protéines, 24 sont retrouvées dans des QTL de tendreté.
- Parmi ces 75 protéines, 13 protéines sont prédites comme sécrétées par des voies de sécrétion « conventionnelles » ou « non-conventionnelles » (UPS). Parmi ces 13 protéines, 4 protéines sont identifiées dans un atlas de protéines micro-vésiculaires (VEs) et/ou un atlas de protéines exosomales.
- Parmi ces 75 protéines, 44 protéines semblent être sécrétées par des UPS associées avec des systèmes des sécrétions vésiculaires de type VEs ou exosomes. Parmi ces 44 protéines, 12 protéines sont identifiées dans un atlas de protéines VEs et/ou exosomales.
- Pour la première fois nous proposons que les UPS vésiculaires soient en lien avec la tendreté de la viande.
- L'analyse de la bibliographie récente (postérieure à la création de la base de données) a permis d'identifier 4 protéines plasmatiques candidates supplémentaires : COL4A1, HSPA5, ORM1 et PDIA3.
- Une liste de 33 candidats d'intérêt parmi lesquels 24 sont retrouvés dans des QTL de tendreté (les plus pertinents) est finalement proposée à l'issue de cette étude *in silico*.

La préparation de la base de données aura été une étape primordiale dans mon travail de thèse qui a demandé 6 mois. Il a fallu faire des choix pour recenser les données les plus significatives comportant un maximum d'informations associées aux identifiants (ID) Gene Names recensés. La catégorisation et l'homogénéisation des ID a également pris énormément de temps car il n'existe toujours pas de règles à respecter pour la publication des résultats associés à des identifiants protéiques (Numéro d'accession, ID Gene Name, ID Uniprot, ID GeneBank). Nous avons choisi les ID Gene Names afin de traiter

ID Gene Name	QTL	Protéines VEs (HPA, n=1998)	Protéines exosomales (Exocarta, n=100)	Protéines retrouvées dans Picard & Gagaoua 2019
13 predicted secreted proteins + plasma (conventional and UPS)				
APOE		X		
ATP2A2	Shear force (Ch. 17)			
CDH13				
COL11A1				
CUBN				
EPHA7				
GAPDH		X	X	X
GLG1				
LGALS3BP			X	
MPO		X		
PCDH7				
PRDX6				
TG				
44 hypothetically secreted proteins + plasma				
ACTA1				X
ACTB		X		
ACTC1	Tenderness score (Chr.10)			
ALB		X		X
ATP5B				
BPGM				
CAPN2				
CASP8				
CCT8				
CENPF				
CKM				
COL13A1				
DES				
ENO3				X
FASN		X		
FGF12				
FLNA		X		
GBP1				
HBB	Shear force (Ch.15)			
HSP90AA1	Shear force (Chr.21)	X		
HSPA1A		X	X	
HSPA1B		X		
IGF1R		X		
LAMC1	Shear force (Chr.22)			
LDHA	Shear force (Ch.29)	X	X	
LDHB	Shear force (Ch.5)	X		
LOX				
LRRC16A				
MYH2				
MYH3				
MYH7				X
NID1				
PGAM2				
PGK1		X		
PPARG	Shear force (Chr.22)	X		
PRDX3				
PSMB2				
PVALB	Shear force (Chr.5)			
RGS2				
SDHB				
TPM1	Tenderness score (Chr.10)			
TPM3				
TUFM				
YWHAG		X		
14 plasma proteins from Network/QTL				
CASP8AP2	Tenderness score (Chr.9)			
ACTN1	Tenderness score (Chr.10)			
CAT	Shear force (Chr.15)	X		
CCNB2	Tenderness score (Chr.10)			
CFL1	Tenderness score and Shear force (Chr.29)		X	
GSS	Shear force (Chr.13)			
MAPK1	Shear force (Chr.17)			
NEFL	Shear force (Chr.8)			
PRKACB	Shear force (Chr.3)			
PSMA7	Shear force (Chr.13)			
USP8	Tenderness score (Chr.10)			
YWHAB	Shear force (Chr.13)		X	
YWHAZ	Shear force (Chr.14)		X	
ZBTB21	Shear force (Chr.1)			
4 plasma proteins from Picard and Gagaoua, 2019				
COL4A1				X
HSPA5			X	X
ORM1		X		X
PDIA3				X

Tableau 7. Bilan des 75 protéines plasmatiques proposées à l'issue des travaux rapportés dans la publication 1
« X » signifie que la protéine est identifiée dans le répertoire considéré (en tête de colonne) : Atlas de protéines micro-vésiculaires (VEs) et/ou atlas de protéines exosomales et/ou dans un répertoire de candidats musculaires proposé par [Picard et Gagaoua., 2020]. Les 33 candidats d'intérêt parmi lesquels 24 sont retrouvés dans des QTL de tendreté sont identifiés en rouge.

l'ensemble des données protéomiques, transcriptomiques et génomique en termes « protéique ». Au cours de ces travaux de thèse, j'ai pu me familiariser avec plusieurs types d'outils bio-informatiques tels que ProteINSIDE, Cytoscape, REVIGO, REACTOME, OmicsNET, Pathway Studio… Ces outils présentent des spécificités différentes, ce qui m'a permis d'enrichir mes connaissances et compétences pour l'analyse bio-informatique de données de protéomique. Cependant, ces outils utilisant des algorithmes différents, il s'est avéré complexe de faire une comparaison entre les résultats obtenus par 3 de ces outils (ProteINSIDE, Pathway studio et OmicsNET). Nous avons retenu les résultats obtenus grâce à l'outil ProteINSIDE développé par l'équipe. Cet outil permet à l'utilisateur de réaliser une analyse personnalisée selon plusieurs option : (i) analyse de Gene Ontology avec inclusion ou non des termes de GO inférés à partir des annotations électroniques qui sont automatiquement désélectionnées dans l'analyse de base (codes IEA) ; (ii) réalisation de réseaux moléculaires grâce à son interaction avec le web service Cytoscape ; (iii) recherche des interactions protéines-protéines (Ppi) parmi les 31 bases de données proposées par ProteINSIDE (recherche possible dans d'autres espèces en utilisant des protéines orthologues). Il est aussi possible d'étendre le réseau Ppi à des protéines qui ne sont pas présentes dans la base de données de l'utilisateur ; (iv) recherche des protéines sécrétées avec possibilité de régler la sensibilité de détection du peptide signal (Signalp 4.1). Pour la réalisation du réseau moléculaire des candidats proposés par cette étude (visualisation personnalisée), j'ai utilisé le web service Cytoscape, un outil largement décrit et approuvé par la communauté scientifique [Shannon et al., 2003]. Afin que mes résultats ne soient pas biaisés, j'ai utilisé la même base de données de référence (Psicquic, [Aranda et al., 2011]) pour réaliser la Gene Ontology et la recherche des protéines sécrétées dans ProteINSIDE d'une part et pour la création du réseau moléculaire et la recherche de Ppi dans Cytoscape d'autre part.

La base de données a fait l'objet d'un dépôt de DOI sur le portail Dataverse INRAE (https://datainra@inrae.fr) : Boudon and Cassar-Malek. Dataset of proteins related to beef tenderness (2019). ([Boudon and Cassar-Malek, 2019], DOI: 10.15454/7DKRQD). Elle fera également l'objet d'un DATAPAPER (présenté à la suite de cette publication).

En termes de perspectives de ce premier volet de ma thèse, la suite logique était de réaliser une recherche de biomarqueurs dans des d'échantillons plasmatiques sur des animaux contrastés pour la tendreté de la viande (approche globale). Ces travaux ont fait l'objet de la publication 3, détaillée dans la suite de ce manuscrit.

Publication 2

DATA PAPER
Dataset of 469 proteins related to beef tenderness

Sabrina Boudon et Isabelle Cassar-Malek

En préparation

La base de données, constituée lors de la revue systématique de la bibliographie et l'agrégation de données, a également fait l'objet d'un dépôt sur le portail Dataverse INRAE

Boudon S. and Cassar-Malek I. Dataset of proteins related to beef tenderness (2019).

Référence : DOI : 10.15454/7DKRQD; https://datainra@inrae.fr

Data Article

Article Title

Dataset of 469 proteins related to beef tenderness

Authors

Sabrina Boudon[1], Isabelle Cassar-Malek[1],

Affiliations

[1] Université Clermont Auvergne, INRAE, VetAgro Sup, UMR Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

Corresponding author(s)

Isabelle Cassar-Malek (isabelle.cassar-malek@inrae.fr)

EN PREPARATION

Abstract

The beef industry is intended to predict the "meat quality potential" of cattle upstream of slaughter or on carcasses online. Many studies have searched for genes and proteins of whose expression or abundance may be involved in the determinism of beef quality, especially tenderness. Thus, datasets are available in public reporitories and represent a potential gold mine for new discoveries and biomarkers' identification prior to including them into prediction tools. The present data paper describes a dataset of proteins linked to beef quality- namely tenderness- constructed by the aggregation of public omic data. The dataset includes three individual datasets arising from different omic sources (peer-reviewed articles and a public repository). A proteomic dataset was generated from published proteomic studies on muscles differing in their tenderness. A transcriptomic dataset was created from transcriptomic studies evaluating transcript abundances in relation to beef tenderness and informs on the proteins encoded by these transcripts. A genetic dataset gathers proteins encoded by genes for which a polymorphism was related to beef tenderness. The aggregated dataset [DOI: 10.15454/7DKRQD] includes 469 proteins and can be used to for the understanding of molecular mechanisms of tenderness, and for the identification of

set of biomarkers for beef tenderness in muscles or in fluids [1]. New knowledge may be extracted from this aggregated datasets and updated with new proteomic data.

Keywords

Meat quality, cattle, tenderness, transcriptome, proteome, genetic polymorphism

Specifications Table

Subject	Animal Science and Zoology
Specific subject area	We aggregated data from peer-reviewed articles and the GEO database to produce an atlas of unique proteins related to meat tenderness.
Type of data	Table
How data were acquired	Systematic review of the literature
Data format	Analyzed
Parameters for data collection	From a corpus of 158 publications reporting molecular data on beef meat quality - from peer-reviewed journals published between 1999 and 2018- we selected 44 publications with available omic data.
Description of data collection	We collected data from 48 publications on beef quality and from a NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO) dataset after G2R analysis. Protein identifiers or Gene Names (GN) were retrieved from tables in Portable Document Format (PDF) or from supplementary data. Data were extracted with Tabula. A computational workflow was used to aggregate data and produce a dataset of 469 unique proteins.

EN PREPARATION

Data source location	Institution: French National Research Institute for Agriculture, Food and Environment (INRAE) City/Town/Region: Paris Country: France
Data accessibility	In a public repository: Repository name: Portail Data INRA (https://data.inra.fr)) Data identification number: [provide 10.15454/7DKRQD] Direct URL to data: [e.g. https://doi.org/10.15454/7DKRQD] **The URLs will be activated after acceptance of the manuscript.** Private URL for reviewers are:
Related research article	Authors: **Boudon S, Henry-Berger J, Cassar-Malek I.** 2020. Title: Aggregation of omics data and secretome prediction enables the discovery of candidate plasma biomarkers for beef tenderness. Journal: International Journal of Molecular Sciences. DOI: 10.3390/ijms21020664/ in press

Value of the Data

- The dataset of 469 proteins, as an overview of the molecular signature of cattle muscles linked to tenderness, is useful for the understanding of the mechanisms driving muscle conversion into meat.
- Meat Scientists and students in food science will benefit from these data.
- This atlas can be used to i) identify mechanisms of beef tenderness and associated biomarkers in muscles, and ii) identify low invasive biomarkers by mining information for prediction of protein secretion in fluids.

EN PREPARATION

- The dataset has a re-use potential. Consistently to the principles of Replacement, Reduction and Refinement for the use of animals in research, it may provide an alternative to animal experiment by helping making hypotheses prior to further experimentation

Data Description

Overview of the meat tenderness proteome dataset. Of the 44 publications compiled with the selection criteria (see workflow Figure 1), 26 articles were identified as eligible for proteomics: [2,3,12–21,4,22–27,5–11] , 11 articles including one GSE GEO2R analysis (GSE9256, PMID: 18443416) were identified as eligible for transcriptomics: [2,10,35,12,28–34], and 12 articles were identified as eligible for genetics: [28,34,44,45,36–43]. The main objective of this computational data aggregation from 48 publications, with 1299 ID Gene Name (Table 1), is to obtain an overview of meat tenderness proteins independently of muscle, specie, breed, type, sex, age at slaughter, country and methodologies used for tenderness evaluation or differential protein, transcript or gene identification. Methods for protein identification were essentially 2-DE [2,3,14,16,17,19,21–26,4,27,5,6,8–11,13], and Dot-blot [7,12,18], ELISA [15] MALDI-TOF [3,27] or LC-MS/MS [20]. Methods for transcript identification were Microarray [2,10,12,30,34], OligoN [2,30,33,35], RNA-seq [28,32], and RT-qPCR [29–31]. Methods for gene identification were essentially based on SNP and/or QTL analysis [28,36,45,37–44], but also hybridization [34], or PCR-RFLP [43].

The datasets are highly documented for cattle breed, animal types (young bull, bull, steer, heifer, cow), muscle types (M. longissimus dorsi (LD), M. longissimus thoracis (LT), M. rectus abdominis (RA), M. semimembranosus (SM), M. semitendinosus (ST)), geographic area in which the study was carried out (Africa, Asia, Europe, North America, South America), and the methods for meat quality evaluation (Warner-Bratzler-Shear-Force test, sensory evaluation by a tasting panel).

Proteome atlas overview according to omic dataset. Of the 469 unique ID Gene Names present in the atlas (Figure 2), 5 GN were identified in the three omic datasets, whereas 22 were exclusively identified in the proteomic and transcriptomic datasets, 10 GN were exclusively identified in the

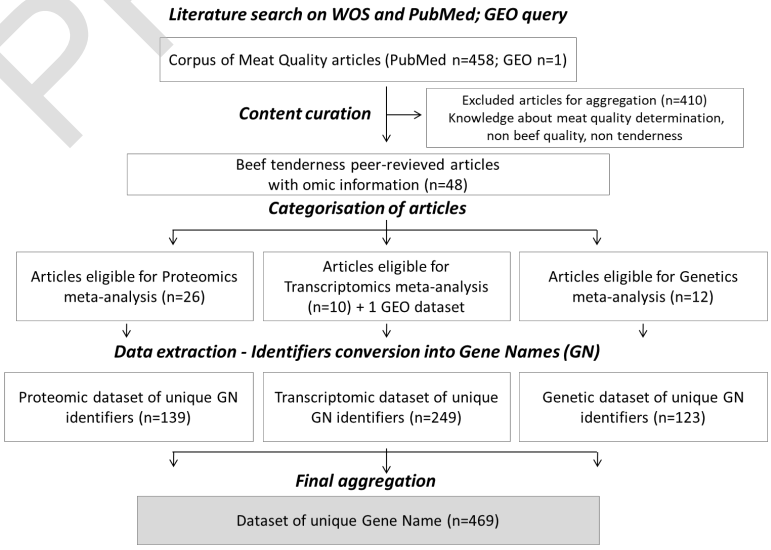
EN PREPARATION

proteomic and genetic datasets and 15 GN were exclusively identified in transcriptomic and genetic datasets.

Experimental Design, Materials, and Methods

Publication database

A computational workflow of the dataset creation (Figure 1) was used to aggregate data from available publications reporting meat tenderness to create an atlas of all proteins present reported as significantly differentially expressed between tender and tough groups. Briefly, we collected publications on meat tenderness by literature boolean operators: "meat OR beef AND tenderness AND biomarkers", "meat AND quality" and "muscle AND beef AND proteome (or "transcriptome", or "genetics") using MEDLINE (PubMed, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/), GOOGLE (Google Scholar, https://scholar.google.fr/) and CLAVIRATE (Web Of Science, https://clarivate.com/products/web-of-science/) analytics search until January 2018. The search provided 458 meat tenderness articles that were reviewed and curated based on the availability of information and one GSE reported transcriptomic data. Only, molecular data related to the meat tenderness on *Bos taurus* and *Bos indicus* were conserved. Cattle protein data could come from individual data but only significant correlation of gene and/or differential abundances of transcripts or proteins with tenderness declared by the authors were conserved to build the meat tenderness proteome atlas.



EN PREPARATION

Figure 1. Flowchart describing the workflow for the construction of the dataset of proteins linked to beef tenderness by the aggregation of public omic data.

Data extraction

Lists of molecular data related to beef quality were extracted from the articles or from the GEO dataset after G2R analysis. This analysis enables to compare two or more groups of samples in order to identify transcripts that are differentially abundant across experimental conditions (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/).

The protein identifiers (ID) or gene symbols were retrieved from tables in Portable Document Format (PDF) or from supplementary data files of the publications. Data were extracted with Tabula (www.tabula.technology, Last update February 11, 2017).

ID standardization

Protein ID and gene symbols were converted into the corresponding gene name (GN), as a unique identifier by use of three tools: Retrieve/ID Mapping tool of the Uniprot database (The UniProt 24), the Protein Identifier Cross-Reference service 25 and/or the ProteCONVERT tool of the ProteINSIDE web interface 26. Last conversion from ID to GN was February 2018.

Datasets' aggregation

Data aggregation generated 3 datasets. Once redundancies were discarded in each dataset, the datasets were composed as follows: Proteomic dataset with 139 unique GN, Transcriptomic dataset with 249 unique GN, and Genetic dataset with 123 unique GN. A Venn diagram (Draw Venn (Diagram) tool from VIB / Ugent) was used to identify GN specifically identified in one or shared between datasets. The final dataset comprised 469 non-redundant GN.

EN PREPARATION

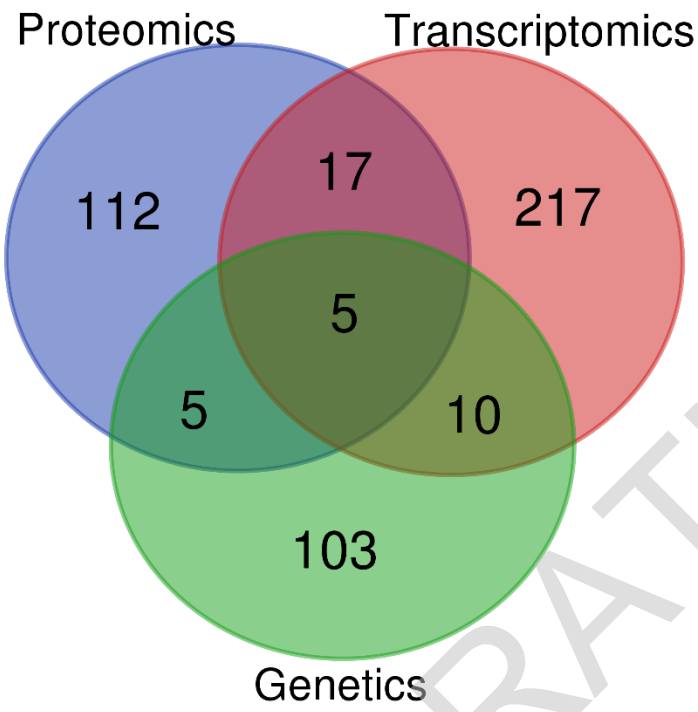


Figure 2: Venn diagram of common and specific ID Gene Names from the proteomic, transcriptomic and genetic dataset.

Re-use potential

Our literature search was based on a thesaurus built in order to target proteins, gene transcripts and genes linked to beef tenderness and was submitted to both search engines of scientific publications (PubMed and Web of Science). The main limitation of the construction of the atlas was the moderate numbers of peer-reviewed studies with sufficient information (12%). Moreover, the atlas aggregates the differential proteins whatever their abundancies. No quantitative information on the abundance of transcripts or proteins is given. The dataset does not provide exhaustive information on proteins isoforms (e.g. alternative splicing isoforms, or posttranslational modifications). It is also probably not exhaustive due to the technology used for data acquisition, data inclusion (loss of data during conversion of ID into GN). Highly documented for muscle type, breed, animal type, sex, age at slaughter and country. All the information gives to the dataset a great potential of data re-use.

EN PREPARATION

Acknowledgments

The authors acknowledge Mylène Delosière and Joelle Henry-Berger for helpful discussions during the preparation of the manuscript.

Competing Interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships, which have, or could be perceived to have, influenced the work reported in this article.

Funding

This work was funded by "the regional council of Auvergne Rhône-Alpes (France)" and the "FEDER (Ressourcement S3, Europe)".

Authors'contribution

I.C.M and SB have designed the aggregation study. SB. has written the main text, curated, extracted and reformatted the original datasets, and constructed the atlas. I.C.M has drafted the manuscript, written part of the text, and reviewed the text.

EN PREPARATION

References

[1] S. Boudon, J. Henry-Berger, I. Cassar-Malek, Aggregation of Omic Data and Secretome Prediction Enable the Discovery of Candidate Plasma Biomarkers for Beef Tenderness, Int. J. Mol. Sci. 21 (2020) 664. https://doi.org/10.3390/ijms21020664.

[2] C. Bernard, I. Cassar-Malek, M. Le Cunff, H. Dubroeucq, 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. https://doi.org/10.1021/jf063372l.

[3] M. Morzel, C. Terlouw, C. Chambon, D. Micol, B. Picard, Muscle proteome and meat eating qualities of Longissimus thoracis of "Blonde d'Aquitaine" young bulls: A central role of HSP27 isoforms, Meat Sci. 78 (2008) 297–304. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.06.016.

[4] N.K. Kim, S. Cho, S.H. Lee, H.R. Park, C.S. Lee, Y.M. Cho, Y.H. Choy, D. Yoon, S.K. Im, E.W. Park, Proteins in longissimus muscle of Korean native cattle and their relationship to meat quality, Meat Sci. 80 (2008) 1068–1073. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.04.027.

[5] 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. https://doi.org/10.1002/pmic.200300688.

[6] S.G. Bjarnadóttir, K. Hollung, M. Høy, E. Bendixen, M.C. Codrea, E. Veiseth-Kent, S.G. Bjarnadottir, K. Hollung, M. Hoy, E. Bendixen, M.C. Codrea, E. Veiseth-Kent, 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 (2012) 2035–2043. https://doi.org/10.2527/jas.2011-4721.

[7] B. Picard, M. Gagaoua, D. Micol, I. Cassar-Malek, J.-F. Hocquette, C.E.M. 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. https://doi.org/10.1021/jf501528s.

[8] M.E. Carvalho, G. Gasparin, M.D. Poleti, A.F. Rosa, J.C.C. Balieiro, C.A. Labate, R.T. Nassu, R.R. Tullio, L.C. de A. Regitano, G.B. Mourão, L.L. Coutinho, Heat shock and structural proteins associated with meat tenderness in Nellore beef cattle, a Bos indicus breed, Meat Sci. 96 (2014) 1318–1324. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.11.014.

[9] T. Chaze, J.-F. Hocquette, B. Meunier, G. Renand, C. Jurie, C. Chambon, L. Journaux, S. Rousset, C. Denoyelle, J. Lepetit, B. Picard, Biological Markers for Meat Tenderness of the Three Main French Beef Breeds Using 2-DE and MS Approach, in: Proteomics in Foods, Springer US, Boston, MA, 2013: pp. 127–146. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5626-1_8.

[10] I. Cassar-Malek, B. Picard, Expression Marker-Based Strategy to Improve Beef Quality, Sci. World J. 2016 (2016) 1–11. https://doi.org/10.1155/2016/2185323.

[11] N.P. Guillemin, C. Jurie, G. Renand, J.-F. Hocquette, D. Micol, J. Lepetit, B. Picard, Different phenotypic and proteomic markers explain variability of beef tenderness across muscles, Int. J. Biol. 4 (2012) 26–38. https://doi.org/10.5539/ijb.v4n2p26.

[12] N. Guillemin, B. Meunier, C. Jurie, I. Cassar-Malek, J.-F. Hocquette, H. Leveziel, B. Picard, Validation of a Dot-Blot quantitative technique for large scale analysis of beef tenderness biomarkers., J. Physiol. Pharmacol. 60 Suppl 3 (2009) 91–7. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19996488 (accessed October 23, 2019).

[13] W.A. Baldassini, C.P. Braga, L.A.L. Chardulo, J.A.I.V. Silva, J.M. Malheiros, L.G. de Albuquerque, T.T. Fernandes, P. de M. Padilha, 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 Chem. 169 (2015) 65–72. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.131.

[14] Y. Boudida, M. Gagaoua, S. Becila, B. Picard, A. Boudjellal, C.H. Herrera-mendez, M. Sentandreu, Y. Boudida, M. Gagaoua, S. Becila, B. Picard, Y. Boudida, M. Gagaoua, S. Becila, M. Sentandreu, A. Ouali, Serine Protease Inhibitors as Good Predictors of Meat Tenderness : Which Are They and What Are Their Functions ? Serine Protease Inhibitors as Good Predictors of Meat Tenderness : Which Are They and What Are Their Functions ?, 8398 (2016). https://doi.org/10.1080/10408398.2012.741630.

[15] A.Y. Chulayo, G. Bradley, V. Muchenje, Effects of transport distance, lairage time and stunning efficiency on cortisol, glucose, HSPA1A and how they relate with meat quality in cattle, Meat Sci. 117 (2016) 89–96. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.03.001.

[16] D. Franco, A. Mato, F.J. Salgado, M. López-Pedrouso, M.M. Carrera, S. Bravo, M.M. Parrado, J.M.J.M. Gallardo, C. Zapata, M. L??pez-Pedrouso, M.M. Carrera, S. Bravo, M.M. Parrado, J.M.J.M. Gallardo, C. Zapata, Tackling proteome changes in the longissimus thoracis bovine muscle in response to pre-slaughter stress, J. Proteomics. 122 (2015) 73–85. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.03.029.

[17] V. Grabež, M. Kathri, V. Phung, K.M. Moe, E. Slinde, M. Skaugen, K. Saarem, B.

EN PREPARATION

Egelandsdal, Protein expression and oxygen consumption rate of early postmortem mitochondria relate to meat tenderness1, J. Anim. Sci. 93 (2015) 1967–1979. https://doi.org/10.2527/jas.2014-8575.

[18] N. Guillemin, C. Jurie, I. Cassar-Malek, J.F. Hocquette, G. Renand, B. Picard, Variations in the abundance of 24 protein biomarkers of beef tenderness according to muscle and animal type, Animal. 5 (2011) 885–894. https://doi.org/10.1017/S1751731110002612.

[19] X. Jia, E. Veiseth-Kent, H. Grove, P. Kuziora, L. Aass, K.I. Hildrum, K. Hollung, Peroxiredoxin-6 A potential protein marker for meat tenderness in bovine longissimus thoracis muscle, J. Anim. Sci. 87 (2009) 2391–2399. https://doi.org/10.2527/jas.2009-1792.

[20] G.-D. Kim, H.-S. Yang, J.-Y. Jeong, Comparison of Characteristics of Myosin Heavy Chain-based Fiber and Meat Quality among Four Bovine Skeletal Muscles., Korean J. Food Sci. Anim. Resour. 36 (2016) 819–828. https://doi.org/10.5851/kosfa.2016.36.6.819.

[21] A. Lana, V. Longo, A. Dalmasso, A. D'Alessandro, M.T. Bottero, L. Zolla, Omics integrating physical techniques: Aged Piedmontese meat analysis, Food Chem. 172 (2015) 731–741. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.09.146.

[22] E. Laville, T. Sayd, M. Morzel, S. Blinet, C. Chambon, J. Lepetit, G. Renand, J.F.F. Hocquette, Proteome changes during meat aging in tough and tender beef suggest the importance of apoptosis and protein solubility for beef aging and tenderization, J. Agric. Food Chem. 57 (2009) 10755–10764. https://doi.org/10.1021/jf901949r.

[23] B. Picard, N. Guillemin, M. Bonnet, S.G. Champanelle, I. Cassar-Malek, N. Guillemin, M. Bonnet, 4.32 - Quest for Novel Muscle Pathway Biomarkers by Proteomics in Beef Production, Compr. Biotechnol. 1 (2011) 395–405. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00297-X.

[24] K.J. Thornton, K.C. Chapalamadugu, E.M. Eldredge, G.K. Murdoch, Analysis of *Longissimus thoracis* Protein Expression Associated with Variation in Carcass Quality Grade and Marbling of Beef Cattle Raised in the Pacific Northwestern United States, J. Agric. Food Chem. 65 (2017) 1434–1442. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02795.

[25] B.C. Bowker, J.S. Eastridge, M.B. Solomon, Measurement of Muscle Exudate Protein Composition as an Indicator of Beef Tenderness, J. Food Sci. 79 (2014) C1292–C1297. https://doi.org/10.1111/1750-3841.12496.

[26] C. Zhao, L. Zan, Y. Wang, M. Scott Updike, G. Liu, B.J. Bequette, R.L. Baldwin VI, J. Song, Functional proteomic and interactome analysis of proteins associated with beef tenderness in Angus cattle, Livest. Sci. 161 (2014) 201–209. https://doi.org/10.1016/j.livsci.2013.11.030.

[27] A. D'Alessandro, S. Rinalducci, C. Marrocco, V. Zolla, F. Napolitano, L. Zolla, Love me tender: An Omics window on the bovine meat tenderness network, J. Proteomics. 75 (2012) 4360–4380. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.02.013.

[28] S. Bongiorni, C.E.M. Gruber, S. Bueno, G. Chillemi, F. Ferr??, S. Failla, B. Moioli, A. Valentini, Transcriptomic investigation of meat tenderness in two Italian cattle breeds, Anim. Genet. 47 (2016) 273–287. https://doi.org/10.1111/age.12418.

[29] X.H. Zhang, Y.X. Qi, X. Gao, J.Y. Li, S.Z. Xu, Expression of ADAMTS4 and ADAMTS5 in longissimus dorsi muscle related to meat tenderness in Nanyang cattle, Genet. Mol. Res. 12 (2013) 4639–4647. https://doi.org/10.4238/2013.October.18.2.

[30] C. Zhao, F. Tian, Y. Yu, J. Luo, Q. Hu, B.J. Bequette, R.L. Baldwin VI, G. Liu, L. Zan, M. Scott Updike, J. Song, Muscle transcriptomic analyses in Angus cattle with divergent

EN PREPARATION

tenderness, Mol. Biol. Rep. 39 (2012) 4185–4193. https://doi.org/10.1007/s11033-011-1203-6.
[31] J.M. Malheiros, C.E. Enríquez-Valencia, B.O. da Silva Duran, T.G. de Paula, R.A. Curi, J.A.I.I. de Vasconcelos Silva, M. Dal-Pai-Silva, H.N. de Oliveira, L.A.L. Chardulo, Association of CAST2 , HSP90AA1 , DNAJA1 and HSPB1 genes with meat tenderness in Nellore cattle, Meat Sci. 138 (2018) 49–52. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.01.003.
[32] L.F.S. Fonseca, D.F.J. Gimenez, D.B. dos Santos Silva, R. Barthelson, F. Baldi, J.A. Ferro, L.G. Albuquerque, Differences in global gene expression in muscle tissue of Nellore cattle with divergent meat tenderness, BMC Genomics. 18 (2017) 945. https://doi.org/10.1186/s12864-017-4323-0.
[33] J.-F. Hocquette, S. Lehnert, W. Barendse, I. Cassar-Malek, B. Picard, Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality, Animal. 1 (2007) 159–173. https://doi.org/10.1017/S1751731107658042.
[34] J.-F. Hocquette, C. Bernard-Capel, V. Vidal, B. Jesson, H. Levéziel, G. Renand, I. Cassar-Malek, The GENOTEND chip: a new tool to analyse gene expression in muscles of beef cattle for beef quality prediction, BMC Vet. Res. 8 (2012) 135. https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-135.
[35] H.J. Kee, E.W. Park, C.K. Lee, Characterization of beef transcripts correlated with tenderness and moisture, Mol. Cells. 25 (2008) 428–437.
[36] Y.Y. Fan, L. Sen Zan, C.Z. Fu, W.Q. Tian, H.B. Wang, Y.Y. Liu, Y.P. Xin, Three novel SNPs in the coding region of PPARγ gene and their associations with meat quality traits in cattle, Mol. Biol. Rep. 38 (2011) 131–137. https://doi.org/10.1007/s11033-010-0086-2.
[37] S. Allais, L. Journaux, H. Levéziel, N. Payet-Duprat, P. Raynaud, J.F. Hocquette, J. Lepetit, S. Rousset, C. Denoyelle, C. Bernard-Capel, G. Renand, Effects of polymorphisms in the calpastatin and μ-calpain genes on meat tenderness in 3 French beef breeds, J. Anim. Sci. 89 (2011) 1–11. https://doi.org/10.2527/jas.2010-3063.
[38] C. Avilés, F. Peña, O. Polvillo, M. Barahona, M.M. Campo, C. Sañudo, M. Juárez, A. Horcada, M.J. Alcalde, A. Molina, Association between functional candidate genes and organoleptic meat traits in intensively-fed beef, Meat Sci. 107 (2015) 33–38. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.04.005.
[39] L. Gui, H. Wang, S. Wei, Y. Zhang, L. Zan, Molecular characterization, expression profiles, and analysis of Qinchuan cattle SIRT1 gene association with meat quality and body measurement traits (Bos taurus), Mol. Biol. Rep. 41 (2014) 5237–5246. https://doi.org/10.1007/s11033-014-3393-1.
[40] C.E. Rexroad III, G.L. Bennett, R.T. Stone, J.W. Keele, S.C. Fahrenkrug, B.A. Freking, S.M. Kappes, T.P.L. Smith, Comparative mapping of BTA15 and HSA11 including a region containing a QTL for meat tenderness, Mamm. Genome. 12 (2001) 561–565. https://doi.org/10.1007/s0033500-20028.
[41] P.C. Tizioto, J.E. Decker, J.F. Taylor, R.D. Schnabel, M.A. Mudadu, F.L. Silva, G.B. Mourão, L.L. Coutinho, P. Tholon, T.S. Sonstegard, A.N. Rosa, M.M. Alencar, R.R. Tullio, S.R. Medeiros, R.T. Nassu, G.L.D. Feijó, L.O.C. Silva, R.A. Torres, F. Siqueira, R.H. Higa, L.C.A. Regitano, Genome scan for meat quality traits in Nelore beef cattle, Physiol. Genomics. 45 (2013) 1012–1020. https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00066.2013.
[42] A. Gurgul, T. Szmatoła, K. Ropka-Molik, I. Jasielczuk, K. Pawlina, E. Semik, M. Bugno-
EN PREPARATION

Poniewierska, Identification of genome-wide selection signatures in the Limousin beef cattle breed, J. Anim. Breed. Genet. 133 (2016) 264–276. https://doi.org/10.1111/jbg.12196.

[43] G.-Y. Hou, Z.-R. Yuan, X. Gao, J.-Y. Li, H.-J. Gao, J.-B. Chen, S.-Z. Xu, Genetic Polymorphisms of the CACNA2D1 Gene and Their Association with Carcass and Meat Quality Traits in Cattle, Biochem. Genet. 48 (2010) 751–759. https://doi.org/10.1007/s10528-010-9357-9.

[44] L.F.B. Pinto, J.B.S. Ferraz, V.B. Pedrosa, J.P. Eler, F.V. Meirelles, M.N. Bonin, F.M. Rezende, M.E. Carvalho, D.C. Cucco, R.C.G. Silva, Single nucleotide polymorphisms in CAPN and leptin genes associated with meat color and tenderness in Nellore cattle, Genet. Mol. Res. 10 (2011) 2057–2064. https://doi.org/10.4238/vol10-3gmr1263.

[45] Y. Ramayo-Caldas, G. Renand, M. Ballester, R. Saintilan, D. Rocha, Multi-breed and multi-trait co-association analysis of meat tenderness and other meat quality traits in three French beef cattle breeds, Genet. Sel. Evol. 48 (2016) 37. https://doi.org/10.1186/s12711-016-0216-y.

EN PREPARATION

Publication 3

Label free shotgun proteomics for the identification of protein biomarkers for beef tenderness in muscle and plasma of heifers

Sabrina Boudon, Daoud Ounaissi, Didier Viala, Valérie Monteils, Brigitte Picard et Isabelle Cassar-Malek

Soumis dans « JOURNAL OF PROTEOMICS » le 18 Octobre 2019

En révision depuis le 15 Janvier 2020, après soumission des corrections demandées par les reviewers

Figure 52. Zone géographique d'élevage de l'IGP Fleur d'Aubrac
Représentée en rouge, elle s'étale sur 4 départements : La Lozère, l'Aveyron, le Cantal et la Haute-Loire.

Introduction à la publication 3

Dans cette partie de ma thèse, j'ai répondu aux objectifs 2 à 5 présentés en page 92-93.

Le dispositif expérimental. Les travaux de recherche de ce deuxième volet de ma thèse ont été conduits en partenariat avec la filière de qualité Indication Géographique Protégée Fleur d'Aubrac (IGP FA, reconnue depuis le 3 septembre 2010). En collaboration avec Brigitte Picard, Valérie Monteils et Julien Soulat à l'origine d'un projet de recherche qui vise à mettre en relation des pratiques d'élevage avec les caractéristiques de la carcasse, du muscle et de la viande, nous avons pu bénéficier de prélèvements plasmatiques pour conduire les travaux présentés dans cette publication. Le dispositif expérimental est constitué de 96 Génisses de l'IGP Fleur d'Aubrac (FA), nées entre Décembre 2012 et Mai 2013. Ces animaux ont été abattus entre Février 2015 et Juin 2016 à 999 jours (±69 jours) dans un abattoir commercial aux normes Françaises de réglementations relatives au bien-être animal [Soulat et al., 2018].

La production des génisses IGP Fleur d'Aubrac s'appuie sur un cahier des charges particulier [Legifrance, 2008] selon lequel, les éleveurs doivent être adhérents à la Coopérative d'ELevage Inter-régionale Allaitante (CELIA) et principalement localisés dans les départements de l'Aveyron et de la Lozère **(Figure 52)**. Depuis 2014, l'ensemble des génisses Fleur d'Aubrac est abattu à l'abattoir du Gévaudan à Antrenas (Société Languedoc Lozère Viande, Lozère (48)) qui se situe dans la zone de l'IGP. Les carcasses sont principalement revendues en boucheries traditionnelles. Les génisses sont, pour la majorité, élevées et engraissées chez des éleveurs naisseurs. Le sevrage des futures génisses Fleur d'Aubrac ne doit se faire qu'après l'âge de 6 mois. À partir de 18 mois, les génisses ne doivent plus recevoir de maïs, quelle que soit la forme sous laquelle il est distribué. Ces animaux doivent être élevés au pâturage durant au moins 4 mois/an et doivent avoir une phase de finition de 4 mois minimum. Les génisses doivent être abattues entre 26 et 42 mois d'âge. Aussi, pour être labélisée « IGP Fleur d'Aubrac », la carcasse des génisses doit peser au minimum 330 kg, avoir une note d'état d'engraissement de 2 ou 3 et avoir une conformation entre E+ et R+.

Prélèvement des échantillons. Afin de réaliser des mesures d'abondance de protéines musculaires, potentiels biomarqueurs de tendreté, des échantillons de 5g de muscle ont été prélevés à l'abattage sur les 76 génisses. : muscle *Rectus abdominis* (RA, bavette de flanchet) et *Longissimus* (LM, noix d'entrecôte). Les prélèvements ont été effectués du côté droit de la carcasse, 24h après l'abattage des animaux, congelés dans l'azote liquide et maintenus à -80°C jusqu'à utilisation pour l'analyse protéomique

$$\text{Index (Idx)} = \frac{Tg - m(Tg)}{\sigma(Tg)} - \frac{WB - m(WB)}{\sigma(WB)}$$

Figure 53. Formule mathématique pour déterminer l'indice synthétique de la tendreté Idx

m : moyenne, Tg: note de tendreté sensorielle, WB: note de tendreté mécanique évaluée par la Warner Bratzler shear force, **σ**: écart-type

(Shotgun LC-MS/MS). En parallèle, ces deux muscles ont également fait l'objet d'un prélèvement afin de réaliser des analyses sensorielles et rhéologiques (Warner Brazler Shear Force, ou WB). Ces analyses ont été réalisées par l'école d'ingénieur de Bordeaux Sciences Agro sur des échantillons de viande maturée sous vide à +4°C durant 14 jours puis congelés à -20°C. Les analyses du muscle RA ont été réalisées rapidement à la suite des prélèvements, celles du muscle LT n'ont été réalisées qu'en Juin 2018. De nombreuses caractéristiques liées à l'animal ont été recueillies sur ces 76 animaux tels que : le poids vif à l'abattage (kg), le poids fiscal carcasse (poids de la carcasse froide, kg), le rendement carcasse (%), le poids de naissance (kg), l'âge à l'abattage (jours), les analyses physicochimiques (pH à 24h), l'évaluation mécanique de la tendreté (WB, 1cm^2), ainsi que les analyses sensorielles (tendreté, jutosité, flaveur) associées avec les résidus de mastication et l'appréciation globale [Soulat et al., 2018].

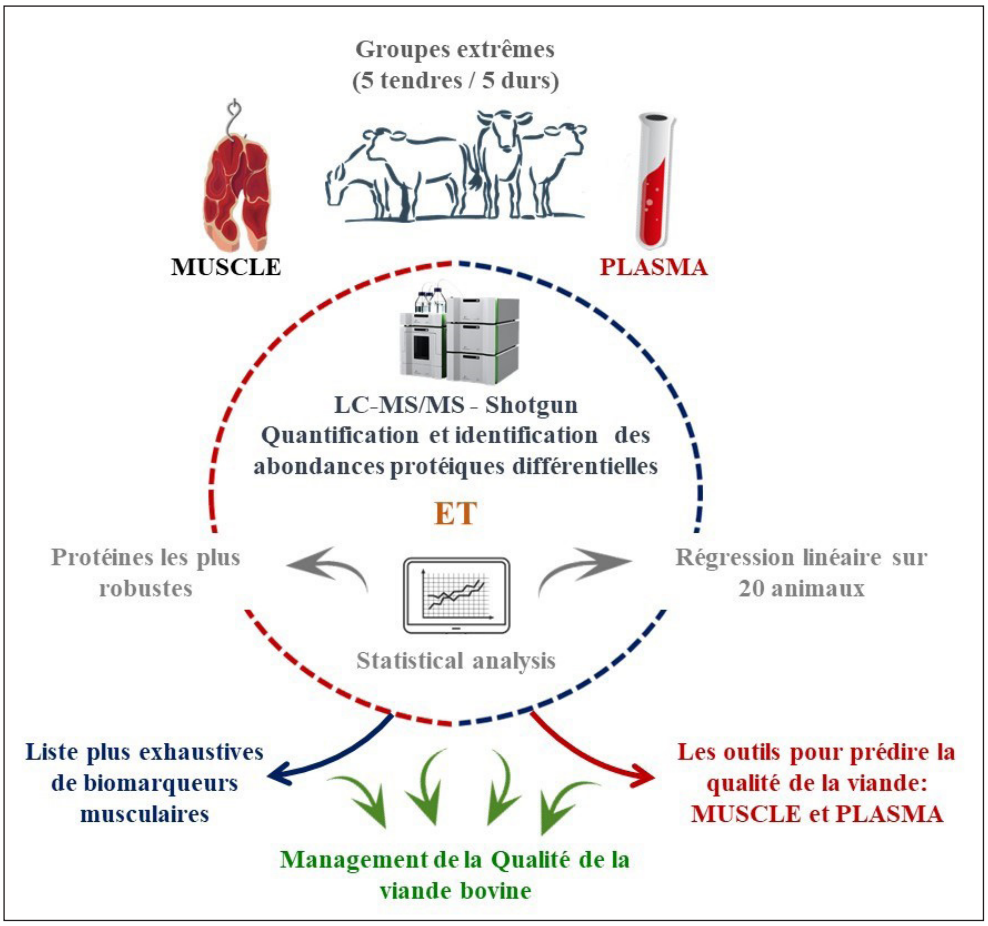
Contexte de l'étude et objectifs. Suite à des contraintes d'ordre techniques (animaux mis à l'herbe plus tôt que prévu par manque de fourrage), 13 génisses n'ont pas été soumises au prélèvement plasmatique. Ainsi, nous disposons de 66 prélèvements de plasma pour réaliser l'étude de « découverte » de biomarqueurs plasmatiques, pour lesquels nous disposons de l'ensemble des données sensorielles et de WB.

Cette étude avait pour objectif d'identifier, sur la base de données expérimentales, des candidats biomarqueurs de tendreté peu-invasifs dans le plasma et/ou « génériques » entre le muscle et le plasma. La démarche retenue consiste à réaliser une analyse protéomique, basée sur une approche « Shotgun », sur des échantillons musculaires et plasmatiques d'individus contrastés pour la tendreté de la viande selon la démarche expérimentale (ou Worflow) présentée ci-après. La recherche et la sélection des protéines différentielles s'est faite à partir de groupe extrêmes de tendreté pour le muscle *Longissimus* (LM).

La démarche expérimentale comprend plusieurs étapes :

1- **La détermination de groupes d'animaux contrastés pour la tendreté.** Les groupes d'extrêmes (5 animaux tendres/5 animaux durs) ont été définis à partir de trois systèmes d'évaluation : l'évaluation mécanique (WB), sensorielle (Tg) et également à partir d'un index synthétique combinant ces deux systèmes de notation (Idx) **(Figure 53)**.

2- **L'analyse Protéomique des échantillons musculaires et plasmatiques.** Une extraction protéique à partir des échantillons musculaires issus d'animaux contrastés pour la tendreté a été réalisée. Afin de réduire la gamme dynamique des concentrations protéiques pour améliorer la détection des


Groupes extrêmes
(5 tendres / 5 durs)
MUSCLE
PLASMA
LC-MS/MS - Shotgun
Quantification et identification des abondances protéiques différentielles
ET
Protéines les plus robustes
Régression linéaire sur 20 animaux
Statistical analysis
Liste plus exhaustives de biomarqueurs musculaires
Les outils pour prédire la qualité de la viande: MUSCLE et PLASMA
Management de la Qualité de la viande bovine

protéines faiblement abondantes du plasma (potentiel biomarqueurs), les échantillons plasmatiques de ces animaux ont été préalablement traités par la méthode CPLL (Proteominer®), voir chapitre 2 de la synthèse bibliographique [Sihlbom et al., 2008]. Les extraits protéiques plasmatiques et musculaires ont été analysés en protéomique selon la stratégie Shotgun LC-MS/MS [Brown et al., 2013], décrite dans ce même chapitre.

3- **L'analyse statistique des données protéomiques.** Après avoir déterminé la meilleure méthode de normalisation des données, en fonction des groupes contrastés considérés (voir publication 3), plusieurs types d'analyses ont été réalisés afin d'identifier les protéines candidates les plus robustes pour évaluer la tendreté :

- ***Une analyse de variance*** afin de révéler les protéines dont l'abondance était significativement différente entre les groupes extrêmes.
- ***Une analyse de corrélation*** pour sélectionner les protéines les plus corrélées avec la tendreté
- **Une analyse de régression linéaire** de type Partial least squares régression (ou PLS) pour identifier les protéines les plus explicatives de la tendreté (VIP > 0,8).
- **Une régression linéaire** réalisée sur l'ensemble des 20 individus du dispositif expérimental, afin de valider la sélection des protéines les plus « robustes » identifiées dans l'analyse différentielle.

Démarche expérimentale / Workflow

Voir Workflow ci-contre.

*Manuscript
Click here to download Manuscript: Boudon et al_manuscript_revised.docx Click here to view linked References

Label free shotgun proteomics for the identification of protein biomarkers for beef tenderness in muscle and plasma of heifers

Sabrina Boudon[1] (ORCID 0000-0003-0854-3432), Daoud Ounaissi[1] (ORCID 0000-0002-0576-5059), Didier Viala[2,3], Valérie Monteils[1] (ORCID 0000-0002-9234-3451), Brigitte Picard[1] (ORCID 0000-0002-8075-6718) Isabelle Cassar-Malek[1] (ORCID 0000-0001-7407-1408)

[1]Université Clermont Auvergne, INRAE, VetAgro Sup, UMR Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

[2] UR370, Qualité des Produits Animaux, INRAE, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

[3] Metabolomic and Proteomic Exploration Facility (PFEM), INRAE, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

*Corresponding author: isabelle.cassar-malek@inrae.fr

Phone number: +33 4 73 62 46 57

ABSTRACT

Meat quality prediction is a priority for the beef industry. Label free shotgun proteomics was performed on *Longissimus* muscle and plasma from 20 crossbred Charolais x Aubrac beef heifers, classified as subgroups of 5 extreme tender and 5 extreme tough meat according to sensory evaluation, Warner Bratzler shear force, and a synthetic tenderness index. This technique identified 268 proteins in muscle and 136 in plasma. Among them, 71 muscle proteins and 21 plasma proteins discriminated tender and tough groups. These proteins were analyzed to select the most correlated and explicative ones which were used in a linear regression on the 20 heifers. The results validated in heifers 33 muscle proteins previously identified as related with tenderness, and revealed 38 new candidates. Twelve are localized in shear force or tenderness score QTL. Among them ACTN2, ADSSL1, GOT1, HPX, OGDH, OGN, TNNC1 and VCL are proposed as robust candidates with 3 other proteins known to be related with tenderness (MYBPH, CAPZB, MYH1). Examination of the plasma proteome showed 8 putative biomarkers (MYH7, CFH, ENO3, PLA2G2D5, FHL1, GAPDH, MASP2 and SERPINF2). Three of them (MYH7, ENO3 and FHL1) were identified as discriminative of tenderness both in *Longissimus* muscle and in plasma.

UNDER REVIEW

Keywords: LC-MS/MS mass spectrometry, proteome analysis, beef tenderness, biomarkers, muscle, plasma.

SIGNIFICANCE

The label free proteomic approach used in this study allowed to complete the atlas of biomarkers of tenderness of the *Longissimus* muscle. This innovative proteomic approach applied on plasma samples allowed to identify circulating candidate biomarkers for beef tenderness. This low-invasive approach constitutes an interesting alternative to evaluate early the "beef meat potential" of living animals in farm or of the carcass in slaughterhouses.

1. Introduction

The beef meat consumers place a high expectation on the tenderness and solving inconsistent tenderness is a top-priority for the meat sector. For more than 30 years meat scientists have worked on the biomarkers identification for meat tenderness to be integrated into phenotyping tools. Meat tenderness has a multifactorial origin depending on muscle characteristics (fiber, sarcomere, collagen) [1,2], on the animal (age, gender, genetic type) and its rearing management [3,4], but also dependent on the post-mortem proteolysis and key proteins associated [5]. Thus, a combination of biomarkers is necessary to predict this quality trait. Up to now, the search for biomarkers for tenderness has been carried out on muscle samples only.

Several omic approaches including proteomic technologies, developed over the last two decades have been conducted to identify biomarkers for meat tenderness and/or explore the tenderness process (see [6,7] for review). This approach allowed proposing a list of biomarkers and highlighted the interactions between them in the construction of tenderness [8]. Some muscle type or animal type specificities have been evidenced [9]. However, biomarker-based approach has some limitations since the analysis of muscle is done after slaughter or on muscle obtained by biopsy from live animal, which is

UNDER REVIEW

invasive. In this way, blood-based biomarkers offer an alternative low-invasive strategy to predict the meat quality potential on living animals.

Circulating blood, notably through the plasma fraction, is a useful source of biomarkers and can be collected easily through minimal-invasive procedure [10]. In medical research, many studies have investigated blood-based proteomic biomarkers to distinguish healthy and diseased or damaged tissues [11–13]. Nowadays, plasma biomarker researches are tending to spread in a wide variety of domains. Indeed, in the livestock sector, biomarkers were identified for stress in the serum of pigs housed at different stocking rate [14], or Copper deficiency in cattle [15,16].The aim of the present study was to identify putative plasma biomarkers for meat tenderness and to enrich the list of muscle tenderness biomarkers using the label free shotgun technique on heifers.

2. Materials and Methods

Figure 1 presents the workflow used in this study.

2.1. Animals

Twenty crossbreed Charolais x Aubrac heifers of the French protected geographical indication (PGI) Fleur d'Aubrac issued from the protocol described by Soulat et al. [17] were used. The heifers were born between December 2012 and May 2013; they were managed according to the specifications of the PGI and slaughtered between February 2015 and June 2016 in a single industrial slaughterhouse (Abattoir du Gévaudan, Antrenas, France) as described in [17].

2.2. Sample collections

UNDER REVIEW

Muscle sampling. *Longissimus* muscles (LM) were removed from the 5th and 4th ribs, 24 h *post-mortem* for this study. Samples for proteomics were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. Samples for tenderness evaluation were vacuum packaged and aged for 14 days at 4°C, then frozen at -20°C until tenderness evaluation as described in [18]. The choice of LM is justified by the fact that this muscle, considered as an international reference for meat science, has been analysed in previous studies investigating tenderness biomarkers in cattle mainly in young bulls and using two-dimensional electrophoresis.

Plasma sampling. Blood samples were collected from the tail vein (EDTA tubes) in farm before transport to the slaughterhouse and stored at 4°C until processing. After sample centrifugation at 4500 rpm for 20 min at RT, plasma fraction was transferred to another tube with 10 µL PMSF (10mg/mL) and kept at -80°C in aliquot fraction for further analysis.

2.3. Tenderness evaluation and constitution of extreme groups

Tenderness evaluation was performed with two methods as described in Soulat et al. [18]. Sensory evaluation (global tenderness, Tg) was performed thanks to trained panellists according to [19]. LM samples were grilled in a double-face grill at 300°C during 1 min 45 sec resulting an internal cooked temperature of 55°C. The mechanical tenderness evaluation was further instrumentally evaluated through Warner-Bratzler shear force measurement (WB, expressed in N/cm²) using MTS Synergie 200 equipment [20].

Also, as suggested by [21] for considering the genetic/phenotypic close correlation observed between the sensory and mechanical tenderness, a synthetic tenderness index (called Idx) was calculated by combining the difference between the

UNDER REVIEW

standardized sensory and the instrumental values: ((Tg score-means Tg)/standard error Tg)-(WB measurement- means WB)/standard error WB) as described in [22]. The added value of Idx is to combine both mechanical and sensory tenderness to create a more accurate evaluation of the tenderness phenotype. This Idx was already used in the literature [9,22].

Among the 20 heifers, extreme groups were defined for muscle and plasma samples according to the WB, Tg, and Idx tenderness quality traits respectively. These groups contained the samples with the 5 highest tenderness values or the 5 lowest tenderness values for each trait. One sample was shared between the extreme groups for WB, Tg and Idx; 3 were shared between groups for WB and Idx, 6 between groups for Tg and Idx, and 2 between groups for WB and Tg. All further analyses performed were achieved for each of the six groups. The mean values of tenderness scores for WB, Tg and Idx and their significant differences are presented in Table 1.

2.4. Proteins extraction

In order to investigate the protein profile of muscle and plasma samples by LC-MS/MS, appropriated extractions were performed depending on the studied tissue.

Muscle samples. Muscle proteins were extracted using Precelly 24® tissue homogenizer protocol (Berton technologies, Saint Quanetin-en-Yvelines, France). Frozen muscle tissue (80 mg) stored at -80°C was mixed in a buffer containing 50 mM Tris (pH 6.8), 2% SDS, 5% glycerol, 2 mM DTT, 2.5 mM EDTA, 2.5 mM EGTA, 2x HALT phosphatase inhibitor (Perbio 78420), Protease inhibitor cocktail complete MINI EDTA-free (Roche 1836170, 1 tablet/10 mL), 4mM Orthovanadate de sodium (NA3VO4) and 10 mM Fluorure de sodium (NaF). The mixtures were then

UNDER REVIEW

boiled for 3x15 sec / 30 sec break, incubated 10 min at 100°C and centrifuged 15 min at 13000 rpm (15-20°C). The supernatants containing protein lysate were collected and stored at -20°C until further use. Determination of protein concentration was performed with the Pierce commercial assay (Pierce BCA reducing agent compatible kit) with BSA as standard [23].

Plasma samples. In order to increase the chance of detecting proteins of interest, the ProteoMiner^{TM} technology was used as protein enrichment approach (Large-Capacity Kit 163-3007, BioRad Inc., Hercule, CA, USA) [24] to concentrate mid- and low-abundance interest proteins such as albumins, immunoglobulins, fibrinogen or complement proteins [25]. To investigate the protein profile on SDS-PAGE before, plasma samples (1 mL) were loaded on a column with 100 µL ProteoMiner beads buffer (20% beads, 20% v/v aqueous EtOH) and incubated 2h at room temperature in order to allow peptides-ligands linkage. After two centrifugations (2x10000 rpm) and two washes (50 µL wash buffer (150 mM NaCl, 10 mM NaH_2PO4, pH 7.4) and 50 µL distillate water)) to eliminate highly abundant proteins, elution of the bound proteins was performed using elution reagent (5% acetic acid).

2.5. Nano-LC-MS/MS and protein identification

Sample preparation. In order to achieve LC-MS/MS analysis, 100 µg of muscle or plasma protein extracts were concentrated at the interface between 12 % resolving/4% stacking acrylamide gels of 1D/SDS-PAGE. The migration of proteins was performed during 15 min at 80V on Mini-Protean II electrophoresis unit (BioRad, Marnes-La-Coquette, France). Then, gels were stained using colloidal Coomassie blue staining R-250 and two bands at this interface between stacking and resolving gels were excised. These bands included two protein fractions: high molecular weight myofibrillar

UNDER REVIEW

proteins (upper band) and low molecular weights (lower band). Excised bands were washed with 100 µL ammonium bicarbonate (50 mM-50% ethanol, 20 min at room temperature (RT)). After removal of the buffer, they were dehydrated with 100 µl of 100% ethanol (15 min). Reduction and alkylation reactions were performed during 30 min respectively with 10 mM DTT solution at 56°C and with 55 mM iodoacetamide solution protected from light. The bands were washed with 200 µL of 50 mM NH4HCO3 buffer for 15 min at room temperature and destained by 100 µL of 25 mM NH4HCO3 – 5% acetonitrile (v/v) for 15 min followed by three washing with 100 µL of 25 mM NH4HCO3 – 50% acetonitrile (v/v) for 30 min under agitation. Finally all bands were dehydrated with 100% acetonitrile (ACN). The samples were hydrolyzed during 5 hours at 37°C using 48 µl of a 25mM NH4HCO3 - 12.5 ng.µl-1 trypsin solution (V5111, Promega, Charbonnières-les-Bains, France) per band. Peptides were extracted from the gel bands in an ultrasonic field during 10 min with 38.4 µl of 99.9% acetonitrile /0.1% Formic Acid representing 80% of digestion volume. Supernatants were transferred in eppendorf vials and dried using Speed Vac for 60 min and adjusted to 50 µl with a solution (H2O/ ACN/ TFA – 94.95/5/0.05). This solution was transferred into HPLC vials containing a 100µl glass insert before nano LC MS/MS analysis.

Nano-LC-MS/MS analysis. Peptides mixtures were analysed by nano-LC-MS/MS (Thermo Fisher Scientific) using an Ultimate 3000 system coupled to a LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer (MS) with a nanoelectrospray ion source. For each sample, two microliters of peptide mixture were first preconcentrated and desalted at a flow rate of 30 µl/mn on a C18 pre-column 5 cm length X 100 µm (Acclaim PepMap 100 C18, 5µm, 100A nanoViper) equilibrated with Trifluoroacetic Acid (TFA) 0.05% in water. After 6 min, the pre-column was switched online with the analytical C18

UNDER REVIEW

column (Acclaim PepMap 100 - 75 µm inner diameter × 25 cm length; C18 - 3 µm - 100Å) equilibrated with 96 % solvent A (99.9 % H2O, 0.1 % formic acid) and 4 % solvent B (99.9 % ACN, 0.1 % formic acid). Peptides were eluted at a 300 nL/min flow rate according to their hydrophobicity using a 6 to 24% gradient of solvent B for 114 min. Eluates were electro-sprayed in positive-ion mode at 1.6 kV through a nanoelectrospray ion source heated to 250°C. The LTQ Orbitrap Velos MS was used in CID top 15 mode (i.e. 1 full scan MS and the 15 major peaks in the full scan were selected for MS/MS). The parameters of mass spectrometry analysis were as follow: Full-enhanced-scan MS spectra realized in the FTMS ion trap at a resolution of 60000 (tolerance 10 ppm) acquired with 1 microscan (m/z 300 – 1400), dynamic exclusion used with 2 repeat counts, 20 sec repeat duration and 60 s exclusion duration. For MS/MS, isolation width for ion precursor was fixed at 2 m/z, single charged species were rejected; fragmentation used 37% normalized collision energy as the default activation of 0.25 and 10 ms activation time.

Data processing, protein identification and abundances. For raw data processing, MS/MS ion search was performed with Mascot v2.5 (http://www.matrixscience.com) against *bos taurus* database (i.e. ref_bos_taurus, 23970 sequences). The following parameters were considered for the search: precursor mass tolerance of 10 ppm and fragment mass tolerance of 0.5 Da, a maximum of two missed cleavage sites of trypsin, carbamidomethylation (C), oxidation (M) and deamidation (NQ) set as variable modifications. Protein identification was validated when at least two peptides originating from one protein showed statistically significant identity above Mascot scores > 36 with a False Dicovery Rate of 1% (adjusted significance threshold $p < 0.0058$). Ions score is -log10 (P-value), where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 36 indicate identity or extensive

UNDER REVIEW

homology. All the proteins identified in this study correspond to one unique protein identifier as they were annotated by a minimum of two associated specific peptides. For label-free protein quantification analysis, LC-Progenesis was used with the same identification parameters described above. All unique validated peptides of an identified protein were included and the total cumulative abundance was calculated by summing the abundances of all peptides allocated to the respective protein. Statistical analysis was performed using the "between subject design" and p-values were calculated by a repeated measures analysis of variance using the normalized abundances across all runs.

2.6. Statistical analysis

Shotgun analyses were annotated "M_LM" for LM muscle and "P_LM" for the plasma samples on the same heifers. For further statistical analysis, M_LM samples and P_LM were tested independently based on the three extreme groups defined by WB, Tg and Idx.

Dataset normalization. In order to minimize intra-group variance, the most appropriate normalized method of each of the six datasets was determined using R software (version 3.5.1; 2018-07-02) and NormalyzerDE. The efficiency of the 8 normalization methods tested (Median intensity, Mean, Quantile, Variance Stabilizing Normalization (VSN), log2, Robust Linear Regression (RLR), Global Intensity (GI) and CycLoess,) was tested (NormalyserDE package, Normalyzer function, version 1.1.16). For each dataset, the most appropriate normalization method was selected according to several quantitative and qualitative statistical data described in [26]. The optimal normalization was the Quantile method for LM Tg and Idx and the CycLoess method for LM WB. For the plasma, the VSN method

UNDER REVIEW

was retained for Tg and Idx and the Quantile for WB. Raw proteins abundances of each of the six datasets were normalized using the selected method.

Differential abundance proteins analysis. Identification of the differential protein abundances from each of the six datasets was performed using the Normalyzer tool Differential Expression (DE). Only the proteins with differential abundance (P-value≤0.05) were considered for further analysis.

Correlation analysis between differential proteins and tenderness evaluations. Relationships between tenderness traits, - WB, Tg and Idx respectively- and the differential proteins were determined by means of regression and Spearman correlation analyses using the Hmisc package. Correlation analysis was performed from the extreme groups to find the most correlated proteins with tenderness (P-value≤0.05).

Identification of the most explanatory proteins. A Partial Least Squares (PLS) statistical analysis (R-software, mixOmics package, pls function, version 6.6.2) was used to identify how the set of differential proteins, which constitutes the variables, was associated to the tenderness quality traits (WB, Tg, and Idx respectively). Filter method associated with PLS analysis was applied to identify the variable importance in the projection (VIP) in order to select the most important variables (or most explanatory proteins) in the model [27,28].

In order to identify which proteins contributed the most to the models, the Variable Importance in the Projection (or VIP score) was calculated using the mixOmics package (vip function). The PLS_VIP values allow to define a hierarchy of the most explanatory proteins for each tenderness trait (WB, Tg, Idx). Only the variables with VIP>0.8, and more interestingly variables with VIP>1 (underlined in

UNDER REVIEW

the illustrations) were considered to identify putative candidate proteins usable for meat tenderness prediction as previously applied in [29].

The selection of the proteins with the VIP>0.8 related to each of the 6 datasets was performed using the VIP Barplot representation. To illustrate the most explanatory proteins correlated with the three tenderness quality traits (WB, Tg, and Idx), a Principal Component Analysis (PCA) of the VIP's proteins selected was performed using the mixOmics package (pca function, VIP>1 underlined). In order to visualize the group of proteins positively or negatively correlated with WB, Tg and Idx, a Heat map representation of the VIP's protein abundance was performed using the mixOmics package (cim function, VIP>1 underlined).

Linear multiple regression models and validation of proteins in 20 heifers. Multiple regression analyses were performed using the modvarsel package (choicemod function, version 0.0.2) [30] to find the most robust proteins correlated with tenderness in the whole dataset of 20 heifers. Muscle, plasma and the three tenderness evaluation traits (WB, Tg, Idx) were considered as dependent variables, the VIP's proteins (VIP>0.8) were considered as independent variables. The regression coefficients were calculated and the highest coefficients were marked in bold. The regression analyses conducted with WB, Tg and Idx were performed to reveal the most robust candidate proteins related to meat tenderness quality traits.

2.7. Gene ontology analysis

In order to understand the biological functions in which differential proteins are involved, Gene Ontology (GO) analysis was performed with the ProteINSIDE webservice (http://www.proteinside.org; Database is 1.2.11 / last update 16-May-2019) [31]. GO annotation enrichment analysis (Biological Process (BP)) was

UNDER REVIEW

achieved in Human species. Human orthologs' annotations were privileged in order to get the most complete GO information, since bovine annotation remains limited. Muscle and plasma GO were considered independently for GO_BP analysis. Histogram representations of the GO_BP annotations were constructed using only specifications associated with P-value<0.001 with a minimum of annotated proteins≥2 (see supplementary data S1 and S2). The P-values were converted into –log10 (P-value) values, and classified in ascending order in an upward direction. Specifications were annotated as follows: GO annotation (Number of proteins included in the annotated in brackets) Proteins Gene Names tie to GO annotation separated by space. A table listing the major metabolic pathways was constructed using GO_BP TREE from the GO_BP annotations (P-value<0.001, minimum of annotated proteins≥2). In order to find specificity of metabolic pathways associated with the three tenderness quality traits, GO_BP analyses were performed respectively for each of the six datasets.

3. Results

3.1. Differential proteins between extreme groups of tenderness and their GO annotations

Shotgun analysis allowed to quantify 268 muscle proteins with a unique ID and identified with at least 2 peptides in the LM and 136 proteins in the plasma of the same heifers.

Among these proteins, 71 proteins in LM had significant differences (P<0.05) in abundance between extreme groups of tenderness according to WB, Tg, and Idx respectively (Table 2). In the plasma, 21 proteins were differential between the same extreme groups of tenderness (Table 3).

UNDER REVIEW

Further investigation of pathways related to the proteins differentially abundant was carried on by retrieving their Gene ontology (GO) annotation. GO analysis revealed the biological pathways of these differential proteins in LM and in plasma as illustrated in the Supplementary Data 1 and 2 respectively. The major biological pathways are showed in Table 2 and Table 3 respectively. The five major metabolic pathways associated with the 71 differential muscle proteins were "muscle contraction and structure", "metabolism, transport and cell signalling", "muscle energy metabolism", "regulation of cellular process (apoptosis, endocytosis, oxidative stress)", and "autophagy". The four major metabolic pathways associated with the 21 differential plasma proteins were "muscle contraction and structure", "metabolism, transport and signalling", "muscle energetic metabolism", and "immune system, cell defence and homeostasis (angiogenesis, fibrinolysis, blood coagulation, aging)".

3.2. Muscle candidate biomarkers

Among the 71 differential proteins in LM muscle, 26 proteins were significantly differentially abundant between extreme groups of WB (P-value<0.5) (Table 2). Supplementary Data 3 illustrates the values of the correlations (P-value<0.5) between these proteins and the three tenderness traits. Among the 26 proteins the PLS analysis revealed 8 proteins (VIP>1) (ACTN3, ADSSL1, CSRP3, HPX, MYL2, SMTNL1, TNNC1 and TPM3) and 9 proteins (0.8<VIP<1) (ACTA1, ALDOA, EEF1A2, GPI, GSTP1, MYOZ1, MYOZ3, PDLIM7 and PGAM2) which are considered as putative candidate proteins usable for meat tenderness prediction (Figure 2a). The PCA in Figure 2b illustrates that among the 17 proteins the most explicative of WB tenderness (with VIP>0.8), ALDOA, PGAM2, GPI, GSPT1, MYOZ1, PDLIM7, MYOZ3, ADSSL1, HPX, and ACTN3 were positively correlated with WB and

UNDER REVIEW

negatively with Tg and Idx on axis 1. On the the other hand, MYL2, TPM3, TNNC1, EEF1A2, ACTA1, CSRP3, and SMTNL1 were positively correlated with Tg and Idx and negatively with WB on axis 1. These results are in accordance with the values of the correlation coefficient illustrated in the Supplementary Data 3. The Heat Map representation of the 17 proteins shows a group of 10 proteins including ACTN3, ADSSL1, MYOZ3, GSTP1, MYOZ1, ALDOA, PDLIM7, GPI, PGAM2, and HPX as less abundant in the most tender LM and more abundant in the toughest. Conversely, 7 proteins including MYL2, TNNC1, TPM3, EEF1A2, ACTA1, SMTNL1, and CSPR3 were more abundant in the most tender LM and less abundant in the toughest LM. (Figure 3a)

Among the 71 differential proteins in LM muscle, 18 proteins were significantly differentially abundant between extreme groups of Tg tenderness (Table 2). The correlations between these proteins and the three tenderness traits are illustrated in Supplementary Data 3. The PLS analysis revealed proteins (VIP>1) (CAPZB GOT1, MYBPH, NIPSNAP2, OGDH, OGN and VCL) and 6 proteins (0.8<VIP<1) (ADSSL1, CKMT2, HBB, HSPA1L, SLC24A11 and TMOD1) which are considered as putative candidate proteins usable for meat tenderness prediction (Figure 2c). The PCA in Figure 2d illustrates that among these 13 proteins the most explicative of Tg tenderness (with VIP>0.8), VCL, TMOD1, OGN, and MYBPH were positively correlated with WB and negatively with Tg and Idx on axis 1. Conversely, NIPSNAP2, SLC24A11, HSPA1L, CAPZB, CKMT2, ADSSL1, GOT1, OGDH and HBB were positively correlated with Tg and Idx and negatively with WB on axis 1. The Heat Map representation (Figure 3c) of the 13 muscle VIP's proteins correlated with Tg, a group of 4 proteins including OGN, VCL, TMOD1, and MYBPH as less abundant in the most tender LM and more abundant in the toughest. On the contrary,

UNDER REVIEW

9 proteins including NIPSNAP2, SLC25A11, CKMT2, CAPZB, ADSSL1, GOT1, HBB, OGDH, and HSPA1L were more abundant in the most tender LM and less abundant in the toughest.

Among the 71 differential proteins in LM muscle, 37 proteins were significantly differentially abundant between extreme groups of Idx tenderness (Table 2). The correlations between the abundance of these proteins and the three tenderness traits are illustrated in Supplementary Data 3. The PLS analysis revealed 15 proteins (VIP>1) (ACTN2, FABP3, FHL1, HSPB1, KLHL41, LMCD1, MYBPH, MYH1, OGN, OLA1, PARK7, PDLIM7, PGAM2, PGM1 and TNNT3) and 17 proteins (0.8<VIP<1) (ACTN3, AK1, ALDH1A1, ALDH2, ANKRD2, CFL2, CSRP3, EEF1G, ENO3, GLO1, GPI, HSP90AA1, LDHB, MGST3, MYL6B, MYOT and MYOZ2) which are considered as putative candidate proteins usable for meat tenderness prediction (Figure 2e). The PCA in Figure 2f illustrates that among the 32 proteins the most explicative of Idx tenderness (with VIP>0.8), PARK7, PGM1, TNNT3, PGAM2, PDLIM7, GLO1, ACTN3, AK1, MYBPH, ENO3, GPI, ALDH2, OGN, and MYH1 were positively correlated with WB and negatively with Tg and Idx on axis 1. On the other hand, ANKRD2, HSPB1, MYOZ2, CSRP3, MYL6B, LDHB, EEF1G, ACTN2, LMCD1, HSP90AA1, OLA1, MYOT, FABP3, KLHK41, CFL2, ALDH1A1, MGST3, and FHL1 were positively correlated with Tg and Idx and negatively with WB on axis 1. The Heat Map representation (Figure 3e) of the 32 muscle VIP's proteins illustrates, a group of 14 proteins including PGM1, TNNT3, PARK7, ALDH2, PGAM2, GLO1, GPI, AK1, ENO3, MYH1, MYBPH, PDLIM7, ACTN3, and OGN, less abundant in the most tender LM and more abundant in the toughest. Conversely, 18 proteins including ANKRD2, HSPB1, OLA1, LDHB, ACTN2, LMCD1, MYOZ2, MYL6B, EEF1G, CSRP3, KLKL41, HSP90AA1,

UNDER REVIEW

MYOT, FABP3, CFL2, MGST3, ALDH1A1, and FHL1 were more abundant in the most tender LM and less abundant in the toughest LM.

Seven of these proteins (FHL1, CSRP3, ACTN3, PDLIM7, PGAM2, KLHL41, GPI) were common to the WB and Idx, one protein (ADSSL1) was common to the WB and Tg, and two proteins (MYBPH, OGN) were common to the Tg and Idx. As expected, the correlation tables (Supplementary Data 3) and PCAs (Figures 2) showed an opposition between WB and Tg and Idx tenderness. They also showed a positive correlation between Idx and Tg and a negative correlation between Idx and WB. Interestingly, the proteins identified as differential for a tenderness trait are correlated (inversely) with the three tenderness traits (Supplementary Data 3) which confirms their involvement in tenderness whatever the method of evaluation.

3.3. Plasma candidate biomarkers

Among the 21 differential proteins in the plasma, 10 were significantly (P-value<0.5) differentially abundant between extreme groups of WB tenderness (Table 3). The coefficients of correlation (P-value<0.5) between the abundances of these proteins and the three tenderness traits are illustrated in Supplementary Data 4. The PLS analysis revealed 5 proteins (VIP>1) (MYH7, PLA2G2D5, ENO3, CFH and AGT) and 3 proteins (0.8<VIP<1) (SHBG, RNASE4 and GAPDH) which are identified as putative candidate protein usable for meat tenderness prediction (Figure 4a). The PCA in Figure 4b illustrated that among the 8 proteins the most explicative of WB tenderness (with VIP>0.8), SDHB, RNASE4, and AGT were positively correlated with WB and negatively with Tg and Idx on axis 1. On the other hand, GAPDH, ENO3, CFH, PLA2G2D5, and MYH7 were positively correlated with Tg and Idx and negatively with WB on axis 1. The Heat Map representation (Figure 3b)

UNDER REVIEW

of the 8 plasma VIP's proteins correlated with WB shows a group of 3 proteins including RNASE4, AGT and SHBG less abundant in the most tender LM and more abundant in the toughest. Conversely, 5 proteins including ENO3, CFH, PLA2G5D5, MYH7 and GAPDH were more abundant in the most tender LM and less abundant in the toughest LM.

Among the 21 differential proteins in the plasma, 7 proteins were significantly (P-value<0.5) differentially abundant between extreme groups of Tg tenderness (Table 3). The coefficients of correlation (P-value<0.5) between the abundances of these proteins and the three tenderness traits are illustrated in Supplementary Data 4. The PLS analysis revealed 3 proteins (VIP>1) (FHL1, GAPDH and MASP2) and 2 proteins (0.8<VIP<1) (SERPIND1 and F13B) which are identified as putative candidate proteins usable for meat tenderness prediction (Figure 4c). The PCA in Figure 4d illustrated that among the 5 proteins the most explicative of Tg tenderness (with VIP>0.8), FHL1, GAPDH, and SERPIND1 were positively correlated with WB and negatively with Tg and Idx on axis 1. On the contrary, F13B and MASP2 were positively correlated with Tg and Idx and negatively with WB on axis 1. The Heat Map representation (Figure 3d) of the 5 plasma VIP's proteins correlated with Tg shows a group of 3 proteins including SERPIND1, GAPDH, and FHL1 were less abundant in the most tender LM and more abundant in the toughest. Conversely, F13B and MASP2 were more abundant in the most tender LM and less abundant in the toughest LM.

Among the 21 differential proteins in the plasma, 7 proteins were significantly (P-value<0.5) differentially abundant between extreme groups of Idx tenderness (Table 3). The coefficients of correlation (P-value<0.5) between the abundances of these proteins and the three tenderness traits are illustrated in Supplementary Data 4.

UNDER REVIEW

The PLS analysis revealed 4 proteins (VIP>1) (SERPINF2, MASP2, SERPING1 and CFH) and 3 proteins (0.8<VIP<1) (GPX3, HRG and F9) which are identified as putative candidate proteins usable for meat tenderness prediction (Figure 4e). The PCA in Figure 4f illustrated that among the 7 proteins the most explicative of Idx tenderness (with VIP>0.8), SERPINF2, HRG, and SERPING1 were positively correlated with WB and negatively with Tg and Idx on axis 1. On the contrary, MASP2, CFH, GPX3 and F9 were positively correlated with Tg and Idx and negatively with WB on axis 1. The Heat Map representation (Figure 3f) of the 7 plasma VIP's proteins correlated with Idx shows a group of 3 proteins including SERPINF2, SERPING1, and HRG were less abundant in the more tender LM and more abundant in the toughest. Conversely, 4 proteins including GPX3, MASP2, F9, and CFH were more abundant in the most tender LM and less abundant in the toughest LM.

One of these proteins CFH was differentially abundant between extreme groups of WB and Idx, one protein GAPDH was differentially abundant between extreme groups of WB and Tg, and one protein MASP2 differentially abundant between extreme groups to Tg and Idx.

3.4. Linear multiple regression models

The most explanatory proteins of tenderness with VIP >0.8 have been used in a linear multiple regression to predict each tenderness trait in the whole dataset from 20 heifers. The Table 4 illustrates the most accurate equations and the proteins retained in these equations.

Muscle most robust tenderness proteins. For WB, a total of 7 proteins are involved in the linear multiple regression models (SMTNL1, ADSSL1, HPX, ACTN3, TPM3,

UNDER REVIEW

CSRP3, and TNNC1) of which 5 proteins were identified with a high weight of tenderness explanation, putative candidate biomarkers as they explained alone a large part of WB tenderness variability (Table 4). For Tg, a total of 6 proteins are involved in the linear multiple regression models (OGN, MYBPH, GOT1, VCL, OGDH, and CAPZB), of which 4 proteins were identified with a high weight for tenderness explanation, putative candidate biomarkers explaining alone a large part of Tg tenderness variability (Table 4). For Idx, a total of 5 proteins are involved in the linear multiple regression models (MYH1, ACTN2, MYBPH, OGN and PGAM2), of which one protein (PGAM2) was identified with a high weight for tenderness explanation, putative candidate biomarker as they explained alone a large part of Idx tenderness variability (Table 4).

***Plasma most robust tenderness proteins*.** For WB, a total of 4 proteins are involved in the linear multiple regression models (ENO3, PLA2G2D5, CFH and MYH7), on which 2 proteins (CFH and MYH7) were identified with a high weight of tenderness explanation, putative candidate biomarkers explaining alone a large part of WB tenderness variability (Table 4). For Tg, a total of 3 proteins are involved in the linear multiple regression models (FHL1, GAPDH and MASP2), of which MASP2 protein was identified with a high weight of tenderness explanation, putative candidate biomarker explaining alone a large part of Tg tenderness variability (Table 4). For Idx, a total of 3 proteins are involved in the linear multiple regression models (MASP2, CFH and SERPINF2), of which the 2 proteins (CFH and SERPINF2) were identified with a high weight for tenderness explanation, putative candidate biomarkers explaining alone a large part of Idx tenderness variability (Table 4).

These results obtained on 20 samples validated the results obtained with the comparison of the 5-5 extreme groups. They allowed identifying among the candidate

UNDER REVIEW

biomarkers the most robust ones and therefore the most promising ones for the three tenderness traits.

4. Discussion

The prediction and management of the phenotypic traits related to meat production and quality, especially meat tenderness, are a top priority for the beef meat industry. Previous studies have investigated the potential of muscle-derived protein biomarkers for meat quality prediction. However, the muscle biomarkers may not be exhaustive nor generic for predicting the tenderness [32,33].

The search for meat tenderness biomarkers carried out in the last two decades was based mainly on 2-DE- proteomics of muscle samples (see [34] for review). However, although the 2-DE is a very resolute method and allows to reveal post-translational modifications, it has some limitations [35]. It allows the separation of complex mixtures of proteins according to their isoelectric point, molecular mass, solubility, and relative abundance. Thus, it enables detecting exclusively acidic or basic proteins. Very hydrophobic proteins, and in particular membrane proteins are under-represented in 2-DE, as well as the extremely acid or basic proteins (with extreme isoelectric points) [36]. The shotgun method helps overcome the limitations described above, by enabling the detection of a greater range of acidic, basic and hydrophobic proteins simultaneously [37,38]. Therefore, we assumed that the shotgun method would allow to identify a more exhaustive list of muscle biomarkers and also be more suitable for the identification of tenderness biomarkers from plasma, which would allow us to overcome the muscle type effect reported for several biomarkers.

4.1. Candidate muscle biomarkers for tenderness

UNDER REVIEW

As illustrated in Figure 5, the analysis of LM proteins by shotgun proteomics in the present study allowed to confirm some biomarkers (n=33) and to identify proteins (n=38) which were not reported previously in the literature as related with tenderness. The Venn diagram (Figure 5) illustrates the comparison of the list of putative candidate biomarkers of tenderness published in the literature, identified by proteomic or transcriptomic analysis (Boudon, personal communication), with the list of the 71 candidate biomarkers of tenderness arising from of the present study.

The new candidate biomarkers are mainly involved in muscle contraction and structure but also in muscle energy metabolism, *post-mortem* muscle proteolysis (apoptosis, autophagy) and oxidative stress processes (Figure 5). These results are in accordance with the knowledge gained from previous studies [7,33,39]. The new proteins correspond mainly to isoforms of cytoskeletal proteins, new proteins involved in the biological pathways cited previously but also several new proteins involved in metabolism, transport and cell signalling, pathways more generally. These proteins enriched existing knowledge for a better understanding of the mechanisms involved in beef tenderness determinism.

The differences between the results of the present study and the data of the literature could be explained by the proteomic technique used but also by the type of animal studied. The innovative shotgun approach used here for quality traits investigation seems to be a good method to obtain a more exhaustive list of muscle putative tenderness biomarkers. Moreover, the present study was carried on heifers, while the majority of published studies related to meat tenderness were carried on young male and few in cows or steers [40]. The present study shows that the candidate biomarkers of tenderness quantified in the *Longissimus* muscle are in common between heifers and other bovine types. These results validate the list of 33

UNDER REVIEW

previously identified proteins as good potential biomarkers in the *Longissimus* muscle of heifers. In addition, for 11 of these candidate biomarkers were detected as located in a bovine QTL for shear force or tenderness score (results of ProteINSIDE analysis with the private module proteoQTL, http://www.proteinside.org/) (Figure 5), which reinforces the relevance of our results.

Among the 33 proteins previously reported as tenderness biomarkers (Figure 5), 7 proteins (CAPZB, MYBPH, MYH1, ACTN3, CSRP3, PGAM2 and TPM3) could be proposed as robust candidates because they were both identified with a differential abundance between extreme groups of tenderness, significantly correlated with tenderness, identified as VIP's proteins and found in the linear regression performed on the 20 animals of the study. More specifically, the F-actin-capping protein subunit β (CAPZB) identified as positively related with Tg is a capping protein of the thin actin filament which plays a role in thin filament organisation [41,42]. The CAPZB protein was previously described as positively correlated with LM tenderness in bovine and porcine species [9,43,44] in accordance with our study. The Myosin Binding Protein H (MYBPH) identified as negatively related with Tg and Idx was previously described to be negatively correlated with LM tenderness [9,45,46] as observed in the present study. This sarcomere protein known to interact with the thick myosin filament is higher expressed in fast glycolytic fibres. So the negative relation with tenderness found here is consistent with the negative relation observed for Myosin heavy chain-IIx (MYH1), expressed in fast glycolytic fibres as MYBPH [47] This contractile protein, fragmented and released during aging and tenderization, was previously described as a putative proteolysis indicator [48]. As found in the present study, MyHC IIx was described to be negatively correlated with LM tenderness in Charolais and Maine-Anjou cows breeds [40]. However, in the *Semitendinosus* (ST)

UNDER REVIEW

muscle from French beef breeds it was described to be positively correlated with tenderness. This inverse relationships between some contractile proteins and tenderness have been validated by several experiments [9,40]. The α-actinin 3 (ACTN3) identified as positively related with WB and negatively with Idx is an actin-binding protein specifically expressed in fast skeletal muscle fibres. In young bulls, the direction of the correlation depends on muscle type: positively correlated in the fast glycolytic muscle (ST) and negatively correlated in the fast oxido-glycolytic muscle (LT) [9,22] as mentioned previously for the two other fast glycolytic proteins. The Cysteine and glycine-rich protein 3 (CSRP3) identified as negatively related with WB and positively with Idx in the present study was previously described as unfavourable for beef quality including tenderness, juiciness and flavour by a transcriptomic approach in LM from Charolais young bulls [49]. However, this protein has never been found in two-dimensional electrophoresis (2-DE). It is the first time that we described a relation between its abundance and the tenderness. This protein regulates the control of muscle structure, development and cellular differentiation processes. Interestingly, by combination with data about published tenderness QTL (ProteoQTL module of ProteINSIDE), ACTN3 is annotated as included in a tenderness score QTL (Chromosome 29) and CSRP3 in a Shear force QTL (Chromosome 29) (Figure 5) supporting that these two proteins would be a good predictor for beef tenderness. Finally, the Tropomyosin α-3 chain (TPM3) identified as negatively correlated with WB (positively with tenderness) is one of the myofibrillar proteins expressed in slow skeletal muscle [60]. This protein composing a dimer with the TPM2 isoform was described in [58] as favourable with high sensory tenderness quality trait, in accordance with our study. The phosphoglycerate mutase 2 (PGAM2) identified as positively related with WB and negatively with Idx was also

UNDER REVIEW

found to be related with tenderness of *Longissimus* from steers Aberdeen Angus cattle [50]. This protein plays an important role in coordinating energy production with generation of reducing power and the biosynthesis of nucleotide precursors and amino acids. A link of PGAM2 with carcass traits, and especially *post-mortem* maturation processes, was described in an association study performed in 15 breeds of cattle using 389 SNP belonging to 206 candidate genes known to be involved in muscle development, metabolism and structure [51].

These data confirm a positive relationship between tenderness and some contractile proteins of the slow oxidative type and a negative one with some contractile proteins of the fast glycolytic type in the *Longissimus* muscle. They validate also the high implication of contractile proteins in the tenderness of LM comparatively to ST as described in [40]. Furthermore, the results showed that these relationships are the same in heifers and in other animal types.

Among the 38 muscle proteins newly identified in this study thanks to shotgun proteomics (Figure 5), 8 proteins (ACTN2, ADSSL1, GOT1, HPX, OGDH, OGN, TNNC1 and VCL) are proposed as robust candidates because they are identified as a differentially abundant between extreme groups of tenderness, but also significantly correlated with tenderness, identified as VIP's proteins and found in the linear regression performed on all 20 animals (Supplementary Data 4). More specifically, the α-actinin 2 (ACTN2), identified as positively correlated with Idx, is an actin-binding protein as ACTN3 but expressed in both slow and fast skeletal muscle fibres. This protein was described as negatively related with intramuscular fat content [52]. The Adenylosuccinate synthetase isozyme 1 (ADSSL1), identified as positively related with WB, is a protein linked to glycolytic energy metabolism and is described as overabundant in *Longissimus lumborum* muscleof Chinese cattle during *post-*

UNDER REVIEW

mortem periods [53]. The Glutamic-oxaloacetic transaminase 1 (GOT1), identified as positively correlated with Tg, plays a role in amino acid metabolism, glutamate synthesis and the urea and tricarboxylic acid cycles. [54]. Also associated with lipid metabolism and deposit [55], GOT1 would be a good biomarker for meat tenderness (positive correlation) since intramuscular lipid depots are generally positively correlated with meat tenderness [1,56]. The Hemopexin protein (HPX), identified as positively related with WB (negatively with tenderness), is the main vehicle for the heme transport in the plasma which allows to prevent the heme-mediation oxidative stress [57]. Also associated with iron metabolism, this protein was proposed as a biomarker for water-holding capacity in pork meat [58]. Lastly, the Mimecan protein (OGN), identified as negatively related with Tg and Idx, is associated with regulation of the type I collagen fibrillogenesis and its modulation [59]. The protein is produced by muscle tissues and is putatively a crucial humoral bone anabolic factor [60]. OGN is located in a region which corresponds to the QTL interval for several carcass traits significant in pork [61,62]. Interestingly, OGN is also included in a Shear force QTL in cattle as HPX and TNNC1 (Figure 5) supporting that these proteins would be good candidate biomarkers of *Longissimus* meat tenderness.

4.2. Putative plasma biomarkers of tenderness

In the present study we report for the first time 21 proteins with differential abundance in the plasma of heifers differing by the tenderness of their *Longissimus* muscle.

Overall view of the major biological pathways related to these plasma proteins shows the several pathways identified in previous research performed from muscle samples and described above [5,6,44,63–69] but also the signalling pathways of the complement system and coagulation which has been expected considering plasma

UNDER REVIEW

fluid. However, we hypothesized that the cytoskeletal proteins such as Myosin heavy chain-I (MYH7), Tubulin alpha-4A chain (TUBA4A), or β-actin (ACTB) may be proteolytic fragments of proteins excreted by muscle cells. These proteins are not soluble proteins and by consequent are likely not secreted through conventional secretory pathways. However it cannot be excluded that they were secreted through a new secretory pathway. According to [70], muscle cells would be able to secrete proteins through a newly described secretory membrane-derived vesicles shedding and addressed to the plasma membrane [70–72]. During the last decade, the extracellular vesicles (EVs) whether as micro-particles (MPs; 150–300 nm size) or exosomes, 50–100 nm size) have emerged as an important mechanism involved in inter-cellular communication in normal physiologic condition (e.g. heart and muscle development, angiogenesis, and vesicle formation during reticulocyte maturation [73–76]) but also in pathophysiological conditions [77–79]. Recent studies have shown that skeletal muscle is also able to release EVs into the extracellular space [70,80]. According to the authors, muscles crosstalk with tissues and organs through this mechanism and participate to maintain muscle physiology and whole-body homeostasis [81–83].

Among the 21 plasma proteins identified as discriminant between two groups of tenderness, 8 appeared to be robust proteins (CFH, ENO3, FHL1, GAPDH, MASP2, MYH7, PLA2G2D5 and SERPINF2) because identified as differential abundant proteins, but also significantly correlated with tenderness, identified as VIP's proteins and found in the linear regression performed on all 20 animals. More specifically, the complement factor H (CFH), identified as negatively related with WB and positively correlated with Idx, was linked to the signalling pathways of the complement system and coagulation. The β-enolase protein (ENO3) identified as negatively correlated

UNDER REVIEW

with WB (positively with tenderness) and the Four and a half LIM domains 1 protein (FHL1), identified as negatively correlated with Tg, showed an inverse relationship compared to the muscle sample. The β-enolase protein (ENO3), and the Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), identified as negatively related with Tg, are glycolytic enzymes described in muscle as energy metabolism *post-mortem* indicator in the same direction [84,85]. Interestingly, a physiological target of serpin C1-inhibitor, the Mannan-binding lectin serine protease 2 (MASP2), identified as positively correlated with Tg an Idx, is involved in the activation of the complement cascade via the Mannan-binding Lectin (MBL) pathway, a part of the innate immune defence [86]. No previous study has reported any association of MASP2 with muscle phenotype nor for meat tenderness in livestock. The Calcium-dependent phospholipase A2 (PLA2G2D5), identified as negatively correlated with WB (positively with tenderness), is a myotoxic protein previously identified in snake venom and able to affect the sarcoplasmic reticulum *in vivo*. This protein binds to several receptors in muscle plasma membrane and disrupts them but also induces myofibrillar alterations [87]. With regards to tenderness evaluation, this protein, also called PLA2s, seems to be a good putative biomarker for meat tenderness prediction. Finally, among the number of differential Serine Protease Inhibitors (SERPINs) isoforms found in this analysis, the most robust Alpha-2-antiplasmin protein (SERPINF2) is identified as negatively related with Idx. The SERPINF2, a paralog of the SERPING1, is involved in regulation of proteolysis in response to heat stress. The SERPINs act as inhibitors of their target proteases by a specific mechanism and some isoforms (SERPINA3 notably) were described as related to meat tenderness in previous studies [16,88–90].

UNDER REVIEW

Interestingly, the three proteins ENO3, FHL1 and MYH7 are found in muscle but also in plasma. As described previously these proteins are identified as tenderness biomarkers. Although we observed an inverse correlation with tenderness between muscle and plasma abundances, we can hypothesize that these observations are probably due to putative complex regulation in organism, but could be reflect of the status of tenderness biomarker in muscle. The perspectives of this study are to test the relationship between abundances of these proteins and tenderness ranking on a larger panel of individuals.

5. Conclusion

This study is one of the first to use shotgun proteomic approach for the identification of muscle biomarkers related to meat tenderness and the first to research candidate tenderness biomarkers in the plasma. It is also to our knowledge, the first proteomic study in heifers. The main results allowed to validate and complete the list of putative biomarkers of tenderness in LM. Among the 38 new candidates, 8 are proposed as robust candidates for further analysis. The most original result of this study is the detection of 21 proteins of which the abundance in the plasma is related with LM tenderness. Among them 9 proteins are considered as robust candidates. Further analyses are needed to evaluate on a large scale the relationship between their abundance in the plasma and the tenderness of LM. Finally the validated biomarkers of tenderness could be used in diagnostic tool to evaluate or predict the potential of tenderness on living cattle.

Author contributions

SB, ICM and BP defined the experimental design, managed the experiment, co-wrote the paper, and approved the final draft of the manuscript. SB managed and analyzed the

UNDER REVIEW

data, prepared figures and/or tables. DO and SB performed the statistical analysis. VM designed and co-managed the experiments. DV coordinated shotgun analysis. All authors collaborated to interpretation and discussion of the results. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no competing financial interest

Funding Sources

This research was supported by the PGI "Fleur d'Aubrac" through funding from the French regional council of Occitanie (number 17011785) and with funding from the regional council of Auvergne Rhône Alpes (France) and FEDER (Europe). It was included in the program "Investissement d'Avenir" (16-IDEX-0001 CAP 20-25).

Acknowledgements

The authors acknowledge Julien Soulat for monitoring the experiment and for the production of muscle and plasma samples; Pascal Faure for plasma sample collection; Arnaud Delavaud, Nicole Dunoyer, and David Chadeyron for excellent technical assistance; Marie-Pierre Ellies and Sandrine Papillon from Bordeaux Sciences Agro (France) for sensory and instrumental tenderness evaluation.

UNDER REVIEW

References

[1] G. Renand, B. Picard, C. Touraille, P. Berge, J. Lepetit, Relationships between muscle characteristics and meat quality traits of young Charolais bulls, Meat Sci. 59 (2001) 49–60. doi:10.1016/S0309-1740(01)00051-1.

[2] S. Chriki, G. Renand, B. Picard, D. Micol, L. Journaux, J.F. Hocquette, Meta-analysis of the relationships between beef tenderness and muscle characteristics, Livest. Sci. 155 (2013). doi:10.1016/j.livsci.2013.04.009.

[3] M.P. Ellies-Oury, R. Dumont, G. Perrier, M. Roux, D. Micol, B. Picard, Effect of age and carcass weight on quality traits of m. rectus abdominis from Charolais heifers, Animal. (2016) 1–8. doi:10.1017/S1751731116001907.

[4] M. Gagaoua, B. Picard, J. Soulat, V. Monteils, Clustering of sensory eating qualities of beef: Consistencies and differences within carcass, muscle, animal

characteristics and rearing factors, Livest. Sci. 214 (2018) 245–258. doi:10.1016/J.LIVSCI.2018.06.011.

[5] A. Ouali, C.H. Herrera-Mendez, G. Coulis, S. Becila, A. Boudjellal, L. Aubry, M.A. Sentandreu, Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms, Meat Sci. 74 (2006) 44–58. doi:10.1016/j.meatsci.2006.05.010.

[6] B. Picard, M. Gagaoua, Proteomic Investigations of Beef Tenderness, Elsevier Inc., 2017. doi:10.1016/B978-0-12-804007-2.00011-4.

[7] A. D'Alessandro, S. Rinalducci, C. Marrocco, V. Zolla, F. Napolitano, L. Zolla, Love me tender: An Omics window on the bovine meat tenderness network, J. Proteomics. 75 (2012) 4360–4380. doi:10.1016/j.jprot.2012.02.013.

[8] N. Guillemin, M. Bonnet, C. Jurie, B. Picard, Functional analysis of beef tenderness, J. Proteomics. 75 (2011) 352–365. doi:10.1016/j.jprot.2011.07.026.

[9] B. Picard, M. Gagaoua, D. Micol, I. Cassar-Malek, J.-F. Hocquette, C.E.M. 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. doi:10.1021/jf501528s.

[10] S. Surinova, R. Schiess, R. Hüttenhain, F. Cerciello, B. Wollscheid, R. Aebersold, On the Development of Plasma Protein Biomarkers, J. Proteome Res. 10 (2011) 5–16. doi:10.1021/pr1008515.

[11] S. Lista, F. Faltraco, D. Prvulovic, H. Hampel, Blood and plasma-based proteomic biomarker research in Alzheimer's disease, Prog. Neurobiol. 101–102 (2013) 1–17. doi:10.1016/J.PNEUROBIO.2012.06.007.

[12] S.G. Coca, G.N. Nadkarni, Y. Huang, D.G. Moledina, V. Rao, J. Zhang, B. Ferket, S.T. Crowley, L.F. Fried, C.R. Parikh, Plasma Biomarkers and Kidney Function Decline in Early and Established Diabetic Kidney Disease., J. Am. Soc. Nephrol. 28 (2017) 2786–2793. doi:10.1681/ASN.2016101101.

[13] H.C. Beck, M. Overgaard, L. Melholt Rasmussen, Plasma proteomics to identify biomarkers – application to cardiovascular diseases, Transl. Proteomics. 7 (2015) 40–48. doi:10.1016/J.TRPROT.2015.01.001.

[14] A. Marco-Ramell, R. Pato, R. Peña, Y. Saco, X. Manteca, J.L. Ruiz de la Torre, A. Bassols, Identification of serum stress biomarkers in pigs housed at different stocking densities, Vet. J. 190 (2011) e66–e71. doi:10.1016/J.TVJL.2011.01.003.

[15] L.R. Legleiter, J.W. Spears, Plasma diamine oxidase: A biomarker of copper deficiency in the bovine1,2, J. Anim. Sci. 85 (2007) 2198–2204. doi:10.2527/jas.2006-841.

[16] J.K. Grubbs, J.C.M. Dekkers, E. Huff-Lonergan, C.K. Tuggle, S.M. Lonergan, Identification of potential serum biomarkers to predict feed efficiency in young pigs, J. Anim. Sci. 94 (2016) 1482–1492. doi:10.2527/jas2015-9692.

[17] J. Soulat, B. Picard, S. Léger, M.-P. Ellies-Oury, V. Monteils, Preliminary Study to Determinate the Effect of the Rearing Managements Applied during Heifers' Whole Life on Carcass and Flank Steak Quality, Foods. 7 (2018) 160. doi:10.3390/foods7100160.

[18] J. Soulat, V. Monteils, B. Picard, Effect of the Rearing Managements Applied during Heifers' Whole Life on Quality Traits of Five Muscles of the Beef Rib, Foods. 8 (2019) 157. doi:10.3390/foods8050157.

[19] E. Dransfield, J.-F. Martin, D. Bauchart, S. Abouelkaram, J. Lepetit, J. Culioli, C. Jurie, B. Picard, Meat quality and composition of three muscles from French cull cows and young bulls, Anim. Sci. 76 (2003) 387–399.

UNDER REVIEW

doi:10.1017/S1357729800058616.
[20] J. Soulat, B. Picard, S. Léger, V. Monteils, Prediction of beef carcass and meat quality traits from factors characterising the rearing management system applied during the whole life of heifers, Meat Sci. 140 (2018) 88–100. doi:10.1016/J.MEATSCI.2018.03.009.
[21] S. Allais, H. Lev??ziel, J.F. Hocquette, S. Rousset, C. Denoyelle, L. Journaux, G. Renand, Fine mapping of quantitative trait loci underlying sensory meat quality traits in three French beef cattle breeds, J. Anim. Sci. 92 (2014) 4329–4341. doi:10.2527/jas2014-7868.
[22] T. Chaze, J.-F. Hocquette, B. Meunier, G. Renand, C. Jurie, C. Chambon, L. Journaux, S. Rousset, C. Denoyelle, J. Lepetit, B. Picard, Biological Markers for Meat Tenderness of the Three Main French Beef Breeds Using 2-DE and MS Approach, in: Proteomics in Foods, Springer US, Boston, MA, 2013: pp. 127–146. doi:10.1007/978-1-4614-5626-1_8.
[23] B. Picard, M. Gagaoua, M. Al-Jammas, L. De Koning, A. Valais, M. Bonnet, Beef tenderness and intramuscular fat proteomic biomarkers: muscle type effect, PeerJ. 6 (2018) e4891. doi:10.7717/peerj.4891.
[24] S. Murphy, P. Dowling, DIGE Analysis of ProteoMinerTM Fractionated Serum/Plasma Samples, in: Humana Press, New York, NY, 2018: pp. 109–114. doi:10.1007/978-1-4939-7268-5_10.
[25] L. Li, Dynamic Range Compression with ProteoMiner™: Principles and Examples, in: Humana Press, New York, NY, 2015: pp. 99–107. doi:10.1007/978-1-4939-2550-6_9.
[26] A. Chawade, E. Alexandersson, F. Levander, Normalyzer: A Tool for Rapid Evaluation of Normalization Methods for Omics Data Sets, J. Proteome Res. 13 (2014) 3114–3120. doi:10.1021/pr401264n.
[27] T. Mehmood, K.H. Liland, L. Snipen, S. Sæbø, A review of variable selection methods in Partial Least Squares Regression, Chemom. Intell. Lab. Syst. 118 (2012) 62–69. doi:10.1016/J.CHEMOLAB.2012.07.010.
[28] I.-G. Chong, C.-H. Jun, Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present, Chemom. Intell. Lab. Syst. 78 (2005) 103–112. doi:10.1016/J.CHEMOLAB.2004.12.011.
[29] M. Gagaoua, V. Monteils, B. Picard, Data from the Farmgate-to-Meat Continuum Including Omics-Based Biomarkers to Better Understand the Variability of Beef Tenderness: An Integromics Approach, J. Agric. Food Chem. 66 (2018) 13552–13563. doi:10.1021/acs.jafc.8b05744.
[30] M.P. Ellies-Oury, M. Chavent, A. Conanec, M. Bonnet, B. Picard, J. Saracco, Statistical model choice including variable selection based on variable importance: A relevant way for biomarkers selection to predict meat tenderness, Sci. Rep. 9 (2019) 10014. doi:10.1038/s41598-019-46202-y.
[31] N. Kaspric, B. Picard, M. Reichstadt, J. Tournayre, M. Bonnet, ProteINSIDE to easily investigate proteomics data from ruminants: Application to mine proteome of adipose and muscle tissues in bovine foetuses, PLoS One. 10 (2015) 1–24. doi:10.1371/journal.pone.0128086.
[32] B. Picard, B. Lebret, I. Cassar-Malek, L. Liaubet, C. Berri, E. Le Bihan-Duval, J.F. Hocquette, G. Renand, Recent advances in omic technologies for meat quality management, Meat Sci. 109 (2015) 18–26. doi:10.1016/j.meatsci.2015.05.003.
[33] I. Cassar-Malek, B. Picard, Expression Marker-Based Strategy to Improve Beef Quality, Sci. World J. 2016 (2016) 1–11. doi:10.1155/2016/2185323.

UNDER REVIEW

[34] B. Picard, N. Guillemin, M. Bonnet, S.G. Champanelle, I. Cassar-Malek, N. Guillemin, M. Bonnet, 4.32 - Quest for Novel Muscle Pathway Biomarkers by Proteomics in Beef Production, Compr. Biotechnol. 1 (2011) 395–405. doi:10.1016/B978-0-08-088504-9.00297-X.

[35] S. Magdeldin, S. Enany, Y. Yoshida, B. Xu, Y. Zhang, Z. Zureena, I. Lokamani, E. Yaoita, T. Yamamoto, Basics and recent advances of two dimensional- polyacrylamide gel electrophoresis, Clin. Proteomics. 11 (2014) 16. doi:10.1186/1559-0275-11-16.

[36] A. Görg, W. Weiss, M.J. Dunn, Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics, Proteomics. 4 (2004) 3665–3685. doi:10.1002/pmic.200401031.

[37] V. Santoni, M. Molloy, T. Rabilloud, Membrane proteins and proteomics: Un amour impossible?, Electrophoresis. 21 (2000) 1054–1070. doi:10.1002/(SICI)1522-2683(20000401)21:6<1054::AID-ELPS1054>3.0.CO;2-8.

[38] M.P. Molloy, Two-Dimensional Electrophoresis of Membrane Proteins Using Immobilized pH Gradients, Anal. Biochem. 280 (2000) 1–10. doi:10.1006/ABIO.2000.4514.

[39] B. Picard, M. Gagaoua, Proteomic Investigations of Beef Tenderness, Proteomics Food Sci. (2017) 177–197. doi:10.1016/B978-0-12-804007-2.00011-4.

[40] B. Picard, M. Gagaoua, Meta-proteomics for the discovery of protein biomarkers of beef tenderness: An overview of integrated studies, Food Res. Int. 127 (2020) 108739. doi:10.1016/J.FOODRES.2019.108739.

[41] K.A. Clark, A.S. McElhinny, M.C. Beckerle, C.C. Gregorio, Striated Muscle Cytoarchitecture: An Intricate Web of Form and Function, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 18 (2002) 637–706. doi:10.1146/annurev.cellbio.18.012502.105840.

[42] I. Papa, C. Astier, O. Kwiatek, F. Raynaud, C. Bonnal, M.C. Lebart, C. Roustan, Y. Benyamin, Alpha actinin-CapZ, an anchoring complex for thin filaments in Z-line., J. Muscle Res. Cell Motil. 20 (1999) 187–97. doi:10.1023/a:1005489319058.

[43] † René Lametsch, † Anders Karlsson, † Katja Rosenvold, † Henrik Jørgen Andersen, ‡ and Peter Roepstorff, † Emøke Bendixen*, Postmortem Proteome Changes of Porcine Muscle Related to Tenderness, (2003). doi:10.1021/JF034083P.

[44] S.G. Bjarnadóttir, K. Hollung, E.M. Frgestad, E. Veiseth-Kent, 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 (2010) 7408–7414. doi:10.1021/jf100697h.

[45] J. Bouley, B. Meunier, J. Culioli, B. Picard, Analyse protéomique du muscle de Bovin appliquée à la recherche de marqueurs de la tendreté de la viande, Renc. Rech. Rumin. (2004) 87–89.

[46] M.E. Carvalho, G. Gasparin, M.D. Poleti, A.F. Rosa, J.C.C. Balieiro, C.A. Labate, R.T. Nassu, R.R. Tullio, L.C. de A. Regitano, G.B. Mourão, L.L. Coutinho, Heat shock and structural proteins associated with meat tenderness in Nellore beef cattle, a Bos indicus breed, Meat Sci. 96 (2014). doi:10.1016/j.meatsci.2013.11.014.

[47] K.T. Vaughan, F.E. Weber, T. Ried, D.C. Ward, F.C. Reinach, D.A. Fischman, Human Myosin-Binding Protein H (MyBP-H): Complete Primary Sequence, Genomic Organization, and Chromospinal Localization, Genomics. 16 (1993)

UNDER REVIEW

34–40. doi:10.1006/GENO.1993.1136.
[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. doi:10.1016/j.meatsci.2011.07.021.
[49] C. Bernard, I. Cassar-Malek, M. Le Cunff, H. Dubroeucq, 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. doi:10.1021/jf063372l.
[50] C. Zhao, L. Zan, Y. Wang, M. Scott Updike, G. Liu, B.J. Bequette, R.L. Baldwin VI, J. Song, Functional proteomic and interactome analysis of proteins associated with beef tenderness in Angus cattle, Livest. Sci. 161 (2014) 201–209. doi:10.1016/j.livsci.2013.11.030.
[51] S. Dunner, N. Sevane, D. García, O. Cortés, A. Valentini, J.L. Williams, B. Mangin, J. Cañón, H. Levéziel, Association of genes involved in carcass and meat quality traits in 15 European bovine breeds, Livest. Sci. 154 (2013) 34–44. doi:10.1016/j.livsci.2013.02.020.
[52] J. Bazile, B. Picard, C. Chambon, A. Valais, M. Bonnet, Pathways and biomarkers of marbling and carcass fat deposition in bovine revealed by a combination of gel-based and gel-free proteomic analyses, Meat Sci. 156 (2019) 146–155. doi:10.1016/j.meatsci.2019.05.018.
[53] Q. Yu, X. Tian, L. Shao, L. Xu, R. Dai, X. Li, Label-free proteomic strategy to compare the proteome differences between longissimus lumborum and psoas major muscles during early postmortem periods, Food Chem. 269 (2018) 427–435. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2018.07.040.
[54] S. Jiang, Y. Liu, Z. Shen, B. Zhou, Q.W. Shen, Acetylome profiling reveals extensive involvement of lysine acetylation in the conversion of muscle to meat, J. Proteomics. 205 (2019) 103412. doi:10.1016/J.JPROT.2019.103412.
[55] H.-J. Kee, E.-W.P. and C.-K. Lee, Characterization of Beef Transcripts Correlated with Tenderness and Moisture, Mol. Cells. 25 (2008) 428–437. http://www.molcells.org/journal/view.html?year=2008&volume=25&number=3&spage=428 (accessed January 29, 2018).
[56] L.O. Fiems, S.D. Campeneere, S. De Smet, G. Van de Voorde, J.M. Vanacker, C.V. Boucqué, Relationship between fat depots in carcasses of beef bulls and effect on meat colour and tenderness, Meat Sci. 56 (2000) 41–47. doi:10.1016/S0309-1740(00)00017-6.
[57] E. Tolosano, F. Altruda, Hemopexin: Structure, Function, and Regulation, DNA Cell Biol. 21 (2002) 297–306. doi:10.1089/104454902753759717.
[58] A. Di Luca, G. Elia, R. Hamill, A.M. Mullen, 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 (2013) 1528–1544. doi:10.1002/pmic.201200145.
[59] G. Ge, N.-S. Seo, X. Liang, D.R. Hopkins, M. Höök, D.S. Greenspan, Bone morphogenetic protein-1/tolloid-related metalloproteinases process osteoglycin and enhance its ability to regulate collagen fibrillogenesis., J. Biol. Chem. 279 (2004) 41626–33. doi:10.1074/jbc.M406630200.
[60] K. Tanaka, E. Matsumoto, Y. Higashimaki, T. Katagiri, T. Sugimoto, S. Seino, H. Kaji, Role of osteoglycin in the linkage between muscle and bone., J. Biol. Chem. 287 (2012) 11616–28. doi:10.1074/jbc.M111.292193.
[61] P. Beeckmann, J. Schroffel, G. Moser, H. Bartenschlager, G. Reiner, H.

UNDER REVIEW

Geldermann, Linkage and QTL mapping for Sus scrofa chromosome 3, J. Anim. Breed. Genet. 120 (2003) 20–27. doi:10.1046/j.0931-2668.2003.00420.x.

[62] A. Stratil, M. Van Poucke, H. Bartenschlager, A. Knoll, M. Yerle, L.J. Peelman, M. Kopečny, H. Geldermann, Porcine OGN and ASPN: mapping, polymorphisms and use for quantitative trait loci identification for growth and carcass traits in a Meishan × Pietrain intercross, Anim. Genet. 37 (2006) 415–418. doi:10.1111/j.1365-2052.2006.01480.x.

[63] M. Morzel, C. Terlouw, C. Chambon, D. Micol, B. Picard, Muscle proteome and meat eating qualities of Longissimus thoracis of "Blonde d'Aquitaine" young bulls: A central role of HSP27 isoforms, Meat Sci. 78 (2008) 297–304. doi:10.1016/j.meatsci.2007.06.016.

[64] B. Picard, C. Berri, L. Lefaucheur, C. Molette, T. Sayd, C. Terlouw, Skeletal muscle proteomics in livestock production, Briefings Funct. Genomics Proteomics. 9 (2010) 259–278. doi:10.1093/bfgp/elq005.

[65] A. D´Alessandro, C. Marrocco, V. Zolla, M. D´Andrea, L. Zolla, Meat quality of the longissimus lumborum muscle of Casertana and Large White pigs: Metabolomics and proteomics intertwined, J. Proteomics. 75 (2011) 610–627. doi:10.1016/j.jprot.2011.08.024.

[66] V. Grabež, M. Kathri, V. Phung, K.M. Moe, E. Slinde, M. Skaugen, K. Saarem, B. Egelandsdal, V. Grabe??, M. Kathri, V. Phung, K.M. Moe, E. Slinde, M. Skaugen, K. Saarem, B. Egelandsdal, Protein expression and oxygen consumption rate of early postmortem mitochondria relate to meat tenderness, J. Anim. Sci. 93 (2015) 1967–1979. doi:10.2527/jas.2014-8575.

[67] X. Jia, E. Veiseth-Kent, H. Grove, P. Kuziora, L. Aass, K.I. Hildrum, K. Hollung, Peroxiredoxin-6 A potential protein marker for meat tenderness in bovine longissimus thoracis muscle, J. Anim. Sci. 87 (2009) 2391–2399. doi:10.2527/jas.2009-1792.

[68] A. Kwasiborski, T. Sayd, C. Chambon, V. Santé-Lhoutellier, D. Rocha, C. Terlouw, Pig Longissimus lumborum proteome: Part II: Relationships between protein content and meat quality, Meat Sci. 80 (2008) 982–996. doi:10.1016/J.MEATSCI.2008.04.032.

[69] N. Guillemin, C. Jurie, I. Cassar-Malek, J.F. Hocquette, G. Renand, B. Picard, Variations in the abundance of 24 protein biomarkers of beef tenderness according to muscle and animal type, Animal. 5 (2011) 885–894. doi:10.1017/S1751731110002612.

[70] M.C. Le Bihan, A. Bigot, S.S. Jensen, J.L. Dennis, A. Rogowska-Wrzesinska, J. Lainé, V. Gache, D. Furling, O.N. Jensen, T. Voit, V. Mouly, G.R. Coulton, G. Butler-Browne, In-depth analysis of the secretome identifies three major independent secretory pathways in differentiating human myoblasts, J. Proteomics. 77 (2012) 344–356. doi:10.1016/j.jprot.2012.09.008.

[71] E. Cocucci, G. Racchetti, J. Meldolesi, Shedding microvesicles: artefacts no more, Trends Cell Biol. 19 (2009) 43–51. doi:10.1016/J.TCB.2008.11.003.

[72] C. Théry, M. Ostrowski, E. Segura, Membrane vesicles as conveyors of immune responses, Nat. Rev. Immunol. 9 (2009) 581–593. doi:10.1038/nri2567.

[73] M.F. Ribeiro, H. Zhu, R.W. Millard, G.-C. Fan, Exosomes Function in Pro- and Anti-Angiogenesis., Curr. Angiogenes. 2 (2013) 54–59. doi:10.2174/2211552811302002001.

[74] S. Ailawadi, X. Wang, H. Gu, G.-C. Fan, Pathologic function and therapeutic

UNDER REVIEW

potential of exosomes in cardiovascular disease, Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis. 1852 (2015) 1–11. doi:10.1016/J.BBADIS.2014.10.008.
[75] R.M. Johnstone, M. Adam, J.R. Hammond, L. Orr, C. Turbide, Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)., J. Biol. Chem. 262 (1987) 9412–20. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3597417 (accessed October 2, 2019).
[76] J. Meldolesi, Exosomes and Ectosomes in Intercellular Communication, Curr. Biol. 28 (2018) R435–R444. doi:10.1016/J.CUB.2018.01.059.
[77] E.I. Buzas, B. György, G. Nagy, A. Falus, S. Gay, Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases, Nat. Rev. Rheumatol. 10 (2014) 356–364. doi:10.1038/nrrheum.2014.19.
[78] M. Record, K. Carayon, M. Poirot, S. Silvente-Poirot, Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell–cell communication and various pathophysiologies, Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids. 1841 (2014) 108–120. doi:10.1016/J.BBALIP.2013.10.004.
[79] P. Kharaziha, S. Ceder, Q. Li, T. Panaretakis, Tumor cell-derived exosomes: A message in a bottle, Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer. 1826 (2012) 103–111. doi:10.1016/J.BBCAN.2012.03.006.
[80] S. Rome, A. Forterre, M.L. Mizgier, K. Bouzakri, Skeletal Muscle-Released Extracellular Vesicles: State of the Art, Front. Physiol. 10 (2019) 929. doi:10.3389/fphys.2019.00929.
[81] M. Guescini, D. Guidolin, L. Vallorani, L. Casadei, A.M. Gioacchini, P. Tibollo, M. Battistelli, E. Falcieri, L. Battistin, L.F. Agnati, V. Stocchi, C2C12 myoblasts release micro-vesicles containing mtDNA and proteins involved in signal transduction, Exp. Cell Res. 316 (2010) 1977–1984. doi:10.1016/J.YEXCR.2010.04.006.
[82] D.P. Romancino, G. Paterniti, Y. Campos, A. De Luca, V. Di Felice, A. d'Azzo, A. Bongiovanni, Identification and characterization of the nano-sized vesicles released by muscle cells, FEBS Lett. 587 (2013) 1379–1384. doi:10.1016/j.febslet.2013.03.012.
[83] A. Forterre, A. Jalabert, E. Berger, M. Baudet, K. Chikh, E. Errazuriz, J. De Larichaudy, S. Chanon, M. Weiss-Gayet, A.-M. Hesse, M. Record, A. Geloen, E. Lefai, H. Vidal, Y. Couté, S. Rome, Proteomic Analysis of C2C12 Myoblast and Myotube Exosome-Like Vesicles: A New Paradigm for Myoblast-Myotube Cross Talk?, PLoS One. 9 (2014) e84153. doi:10.1371/journal.pone.0084153.
[84] X. Jia, K. Hollung, M. Therkildsen, K.I. Hildrum, E. Bendixen, Proteome analysis of early post-mortem changes in two bovine muscle types:M. longissimus dorsi andM. semitendinosis, Proteomics. 6 (2006) 936–944. doi:10.1002/pmic.200500249.
[85] E. Laville, T. Sayd, M. Morzel, S. Blinet, C. Chambon, J. Lepetit, G. Renand, J.F.F. Hocquette, Proteome changes during meat aging in tough and tender beef suggest the importance of apoptosis and protein solubility for beef aging and tenderization, J. Agric. Food Chem. 57 (2009) 10755–10764. doi:10.1021/jf901949r.
[86] M. Matsushita, S. Thiel, J.C. Jensenius, I. Terai, T. Fujita, Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease., J. Immunol. 165 (2000) 2637–42. doi:10.4049/jimmunol.165.5.2637.
[87] J.M. Gutiérrez, C.L. Ownby, Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity, Toxicon. 42 (2003) 915–931.

UNDER REVIEW

doi:10.1016/J.TOXICON.2003.11.005.
[88] A. Ouali, M. Gagaoua, Y. Boudida, S. Becila, A. Boudjellal, C.H. Herrera-Mendez, M.A. Sentandreu, Biomarkers of meat tenderness: Present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanisms involved, Meat Sci. 95 (2013) 854–870. doi:10.1016/j.meatsci.2013.05.010.
[89] M. Gagaoua, K. Hafid, Y. Boudida, S. Becila, A. Ouali, B. Picard, A. Boudjellal, M.A. Sentandreu, Caspases and Thrombin Activity Regulation by Specific Serpin Inhibitors in Bovine Skeletal Muscle, Appl. Biochem. Biotechnol. 177 (2015) 279–303. doi:10.1007/s12010-015-1762-4.
[90] M. Gagaoua, Y. Boudida, S. Becila, B. Picard, A. Boudjellal, M. Sentandreu, A. Ouali, M. Gagaoua, Y. Boudida, S. Becila, B. Picard, A. Boudjellal, M. Sentandreu, A. Ouali, New Caspases' inhibitors belonging to the serpin superfamily: A novel key control point of apoptosis in mammalian tissues, Adv. Biosci. Biotechnol. 03 (2012) 740–750. doi:10.4236/abb.2012.326095.
[91] Z.-L. Hu, C.A. Park, X.-L. Wu, J.M. Reecy, Animal QTLdb: an improved database tool for livestock animal QTL/association data dissemination in the post-genome era, Nucleic Acids Res. 41 (2013) D871–D879. doi:10.1093/nar/gks1150.

Tables and Figures

Figure captions

Figure 1. Flowchart of the workflow applied for the identification of candidate biomarkers for beef tenderness in the muscle and plasma samples of heifers using a Label free shotgun proteomics.

PGI (protected geographical indication)

Figure 2. PLS_VIP analysis and principal component analysis of the muscle VIP's proteins identified in LM between extreme groups of tenderness.

PLS_VIP analyses are shown in a, c, and e. Principal Component Analyses (PCA) are shown in b, d, and f. Only the proteins with VIP >0.8 are illustrated in PCA, the VIP's proteins>1 are underlined. Distribution of the VIP's proteins was performed for the three meat tenderness evaluations. WB: a, b ; Tg: c, d ; Idx: e, f. WB stands for

UNDER REVIEW

mechanical tenderness evaluation, Tg stands for sensory tenderness evaluation, Idx stands for synthetic tenderness index.

Figure 3. Heat Map representation of the VIP's proteins identified in this study.
VIP's proteins from muscle are shown in a, c and e. VIP's proteins from plasma are shown in b, d and f. Only the proteins with VIP >0.8 are illustrated in Heat Map, the VIP's proteins>1 are underlined. Heat Map representation was performed for the three meat tenderness evaluations. WB: a, b; Tg: c, d; Idx: e, f. WB stands for mechanical tenderness evaluation, Tg stands for sensory tenderness evaluation, Idx stands for synthetic tenderness index. Hierarchical clustering of standardized proteomic data enables to visually group of proteins showing an increased abundance in the high tenderness group, or a decreased abundance in the low tenderness group. The color code allowed to visualize highly-abundance proteins in red and low-abundance proteins in blue.

Figure 4: PLS_VIP analysis and principal component analysis of the plasma VIP's proteins between extreme groups of tenderness.
PLS_VIP analysis are shown in a, c and e. Principal Component Analysis (PCA) are shown in b, d and f. Only the proteins with VIP >0.8 are illustrated in PCA, the VIP proteins>1 are underlined. Distribution of the VIP's proteins was performed for the three meat tenderness evaluations. WB: a, b; Tg: c, d; Idx: e, f. WB stands for mechanical tenderness evaluation, Tg stands for sensory tenderness evaluation, Idx stands for synthetic tenderness index.

UNDER REVIEW

Figure 5. Comparison of the list of proteins identified in this study with the list of candidate biomarkers reported in previous studies.

The Venn diagram shows the intersect of an atlas of proteins related to tenderness in the literature with the list of differential proteins reported in Table 2. The proteins in common to both datasets are validated as good candidate biomarkers in heifers. The proteins specific to the present study are new promising candidate biomarkers.

Query of genetic information was performed with the ProteQTL module included in ProteINSIDE in order to retrieve information on the location of the genes encoding proteins of interest within published Quantitative trait *loci* (QTL) for tenderness. This module interrogates a publicly available QTL library in Animal QTL database [91] that contains cattle QTL and the published data associated.

Supplementary data 1. Gene Ontology enrichment analysis of the 71 differential muscle proteins.

Supplementary data 2. Gene Ontology enrichment analysis of the 21 differential plasma proteins.

Supplementary data 3. Table of Spearman correlations between the differential abundance of the muscle proteins identified in this study. Correlation analysis was performed with the differential proteins detected in the LM. The correlation was performed on the groups of extreme (5 tender /5 tough) for the three meat tenderness evaluations (WB, Tg and Idx). WB stands for mechanical tenderness evaluation, Tg stands for sensory tenderness evaluation, Idx stands for synthetic tenderness index.

Supplementary data 4. Table of Spearman correlations between the differential abundance of the plasma proteins identified in this study.

UNDER REVIEW

Correlation analysis was performed with the differential proteins detected in the plasma. The correlation was performed on the groups of extreme (5 tender /5 tough) for the three meat tenderness evaluations (WB, Tg and Idx). WB stands for mechanical tenderness evaluation, Tg stands for sensory tenderness evaluation, Idx stands for synthetic tenderness index.

UNDER REVIEW

Table 1. Description of extreme groups of tenderness for the three considered traits: Warner-Bratzler shear-force (WB), score of global tenderness evaluated by sensory analysis with trained panellists (Tg), and a synthetic index combining the both (Idx).

Tenderness evaluation	T+ group (n=5) (Mean ± σ)	T- group (n=5) (Mean ± σ)	P-values
WB	33.74 ± 3.47	69.73 ± 11.94	4.30E-04
Tg	7.72 ± 0.16	6.31 ± 0.25	3,05E-06
Idx	1.37 ± 0.15	-1.58 ± 0.44	1,78E-05

Values are expressed as the means ± standard deviation (σ). P-values were calculated by Student's t-test between the tough groups vs. the tender groups. T+/ T- stands for the tender and tough groups respectively, n : number of heifers.

UNDER REVIEW

Table 2. List of the 71 differential proteins detected in the *Longissimus* muscle using the technique. The major Gene Ontology shotgun annotation terms were retrieved using ProteINSIDE.

Differential proteins			WB	Tg	Idx
Accession Number	**Gene Name**	**Full name**	**P-value**	**P-value**	**P-value**
Muscle contraction and structure					
P68138	ACTA1	Actin, alpha skeletal muscle	1.35E-02		
Q3ZC55	ACTN2	Alpha-actinin-2			2.53E-03
Q0III9	ACTN3	Alpha-actinin-3	4.71E-02		4.22E-02
P79136	CAPZB	F-actin-capping protein subunit beta		5.69E-03	
Q148F1	CFL2	Cofilin-2			4.62E-02
Q4U0T9	CSRP3	Cysteine and glycine-rich protein	2.90E-03		5.70E-03
E1BE25	FLNC	Filamin-C	3.49E-02		
A4FV78	KLHL41	Kelch-like protein 41	7.75E-03		9.19E-03
G3X6W9	MYBPH	Myosin-binding protein H		7.54E-03	1.91E-03

UNDER REVIEW

Q9BE40	MYH1	Myosin-1			5.68E-03
Q9BE39	MYH7	Myosin-7	3.22E-02		
F1ME15	MYL2	Myosin regulatory light chain 2	3.93E-02		
Q148H2	MYL6B	Myosin, light chain 6B			6.58E-03
E1BCU2	MYOM3	Myomesin-3			4.31E-02
F1MPU4	MYOT	Myotilin			4.28E-02
Q8SQ24	MYOZ1	Myozenin-1	2.37E-02		
Q5E9V3	MYOZ2	Myozenin-2			1.56E-02
F1N0W6	MYOZ3	Myozenin-3	3.14E-02		
A6H7E3	PDLIM1	PDZ and LIM domain 1		1.05E-02	
Q3SX40	PDLIM7	PDZ and LIM domain protein 7	2.53E-02		6.88E-03
E1BPV6	SMTNL1	Smoothelin-like protein 1	4.21E-02		
A0JNC0	TMOD1	Tropomodulin-1		4.24E-02	
P63315	TNNC1	Troponin C, slow skeletal and cardiac muscles	5.79E-03		
Q8MKH7	TNNT3	Troponin T, fast skeletal muscle			1.44E-03
Q5KR47	TPM3	Tropomyosin alpha-3 chain	4.59E-02		

UNDER REVIEW

F1N789	VCL	Vinculin		3.86E-02	
Metabolism, transport and cell signalling					
A1L578	CAVIN1	Caveolae-associated protein 1	3.40E-02		
Q32PH8	EEF1A2	Elongation factor 1-alpha 2	2.44E-02		
F1MG05	EEF1G	Elongation factor 1-gamma			3.10E-02
F1MR86	FHL1	Four and a half LIM domains protein 1	2.66E-02		9.95E-03
A4FUZ1	GLO1	Lactoylglutathione lyase			2.26E-02
A1A4R1	HIST2H2AC	Histone H2A type 2			4.65E-02
Q17QE2	LMCD1	LIM and cysteine-rich domains protein 1			6.40E-03
Q32KP9	NUTF2	Nuclear transport factor 2		4.06E-02	
Muscle energy metabolism					
P00570	AK1	Adenylate kinase isoenzyme 1			4.88E-02
P48644	ALDH1A1	Retinal dehydrogenase 1			1.90E-02
P20000	ALDH2	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial			3.89E-02
A6QLL8	ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase	4.80E-02		
F1MJT6	CKMT2	Creatine kinase S-type, mitochondrial		4.78E-02	

UNDER REVIEW

A6QR19	ENO2	Gamma-enolase			1.95E-02
Q3ZC09	ENO3	Beta-enolase			2.02E-02
P10790	FABP3	Fatty acid-binding protein, heart			4.25E-03
Q5EA88	GPD1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic	2.62E-02		
Q3ZBD7	GPI	Glucose-6-phosphate isomerase	2.35E-02		2.17E-02
Q5E9B1	LDHB	L-lactate dehydrogenase B chain			2.83E-02
Q08DP0	PGM1	Phosphoglucomutase-1			2.02E-02
Q3SWX4	NIPSNAP2	Protein NipSnap homolog 2		1.01E-02	
P11024	NNT	NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial		4.90E-02	
Q148N0	OGDH	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial		1.19E-02	
Q2HJ33	OLA1	Obg-like ATPase 1			5.32E-03
F1N2F2	PGAM2	Phosphoglycerate mutase	2.02E-02		1.00E-02
P22292	SLC25A11	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein		1.17E-02	
Regulation of cellular process (apoptosis, endocytosis, oxidative stress)					
A5PJR4	ADSSL1	Adenylosuccinate synthetase isozyme 1	2.72E-02	3.94E-02	
A0A140T897	ALB	Serum albumin	4.21E-02		

UNDER REVIEW

F1MX12	ANKRD2	Ankyrin repeat domain-containing protein 2			4.08E-02
P02510	CRYAB	Alpha-crystallin B chain			4.28E-02
G3N0V0	G3N0V0	Uncharacterized protein	1.34E-02		
P33097	GOT1	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic		5.51E-03	
P28801	GSTP1	Glutathione S-transferase P	3.91E-02		
P02070	HBB	Hemoglobin subunit beta		1.30E-02	
P62958	HINT1	Histidine triad nucleotide-binding protein 1		3.89E-02	
Q3SZV7	HPX	Hemopexin	9.51E-03		
Q76LV2	HSP90AA1	Heat shock protein HSP 90-alpha			4.50E-02
P0CB32	HSPA1L	Heat shock 70 kDa protein 1-like		4.05E-02	
Q3T149	HSPB1	Heat shock protein beta-1			2.76E-02
Q3T100	MGST3	Microsomal glutathione S-transferase 3			9.03E-03
G3N088	OGN	Mimecan		6.42E-03	3.15E-02
Q5E946	PARK7	Protein DJ-1			1.22E-02
P68002	VDAC2	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	3.59E-02		
Autophagy					

UNDER REVIEW

A5PK37	EPM2A	Laforin			3.84E-02
E1BAJ4	STBD1	Starch-binding domain-containing protein 1		3.23E-02	

We report muscle proteins identified with a significant differential abundance (P-value < 0.05) between the though group minus the tender group. WB stands for mechanical tenderness evaluation, Tg stands for sensory tenderness evaluation, Idx stands for synthetic tenderness index.

UNDER REVIEW

Table 3. List of the 21 differential proteins detected in the plasma using the shotgun technique. The major Gene Ontology annotation terms were retrieved using ProteINSIDE.

Differential proteins			WB	Tg	Idx
Accession Number	**Gene Name**	**Full name**	**P-value**	**P-value**	**P-value**
Muscle contraction and structure					
F1MM07	MYH7	Myosin-7	4.91E-02		
P81948	TUBA4A	Tubulin alpha-4A chain	4.60E-02		
P60712	ACTB	Actin, cytoplasmic 1		3.47E-02	
Metabolism, transport and cell signalling					
F1MR86	FHL1	Four and a half LIM domains 1		6.31E-04	
F1MQ77	PLA2G2D5	Phospholipase A(2	1.57E-02		
Q58DP6	RNASE4	Ribonuclease 4	4.07E-02		
Muscle energy metabolism					
Q3ZC09	ENO3	Beta-enolase	5.74E-03		

UNDER REVIEW

P10096	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	4.47E-02	4.06E-03	
Immune system, cell defence and homeostasis (angiogenesis, fibrinolysis, blood coagulation, aging)					
Q3SZH5	AGT	Angiotensinogen	4.04E-02		
Q28085	CFH	Complement factor H	4.88E-02		7.98E-03
Q2TBQ1	F13B	Coagulation factor XIII		2.51E-02	
F1MBC5	F9	Coagulation factor IX			4.09E-02
F1MKS5	HRG	Histidine-rich glycoprotein			4.95E-02
F1MNN7	LBP	Lipopolysaccharide-binding protein	3.20E-02		
E1BJ49	MASP2	Mannan-binding lectin serine protease 2		1.66E-02	3.48E-02
A6QPP2	SERPIND1	Heparin cofactor 2		3.79E-02	
P28800	SERPINF2	Alpha-2-antiplasmin			2.30E-02
E1BMJ0	SERPING1	Plasma protease C1 inhibitor			3.57E-02
A5PKC2	SHBG	Sex hormone-binding globulin	3.72E-02		
G3X8D7	GPX3	Glutathione peroxidase			9.41E-03
P56652	ITIH3	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain		4.56E-02	

UNDER REVIEW

We report plasma proteins identified with significant differential abundance (P-value < 0.05) between the though group minus the tender group defined on LM. WB stands for mechanical tenderness evaluation, Tg stands for sensory tenderness evaluation, Idx stands for synthetic tenderness index.

UNDER REVIEW

Table 4. Linear multiple regression models for the three evaluations of beef tenderness.

Tissue	Tenderness	Protein biomarkers [a]	Model characteristics	
			R-squared	RMSE[b]
LM	WB	**HPX (6.14)** **ACTN3 (14.49)** **TPM3 (8.12)** SMTNL1 (-2.33) **CSRP3 (-9.05)** ADSSL1 (2.02) **TNNC1 (-16.41)**	0.70	86.00
	Tg	**GOT1 (0.59)** **VCL (-0.55)** OGN (-0.037) **OGDH (0.13)** MYBPH (-0.076) **CAPZB (0.16)**	0.58	0.022
	Idx	MYH1 (-0.71) ACTN2 (-0.54) MYBPH (0.041) OGN (-0.61) **PGAM2 (-4.40)**	0.56	0.33
Plasma	WB	**MYH7 (-6.31)** **CFH (-23.59)** ENO3 (-2.84) PLA2G2D5 (-1.14)	0.52	24.05
	Tg	FHL1 (-0,14) APDH (0,11) **MASP2(0,39)**	0.38	0.023
	Idx	**CFH (-1.55)** **SERPINF2 (-0.72)** MASP2 (0.35)	0.42	0.085

UNDER REVIEW

The linear regression analysis of the plasma VIP's proteins (VIP>0.8) identified in LM (at the top) and plasma (on the bottom) was performed on the 20 animals of the study for the three meat tenderness evaluations. WB stands for mechanical tenderness evaluation, Tg stands for sensory tenderness evaluation, Idx stands for synthetic tenderness index. RMSE: Root Mean Square Error. For each protein in prediction equation, the correlation coefficients are annotated in brackets.

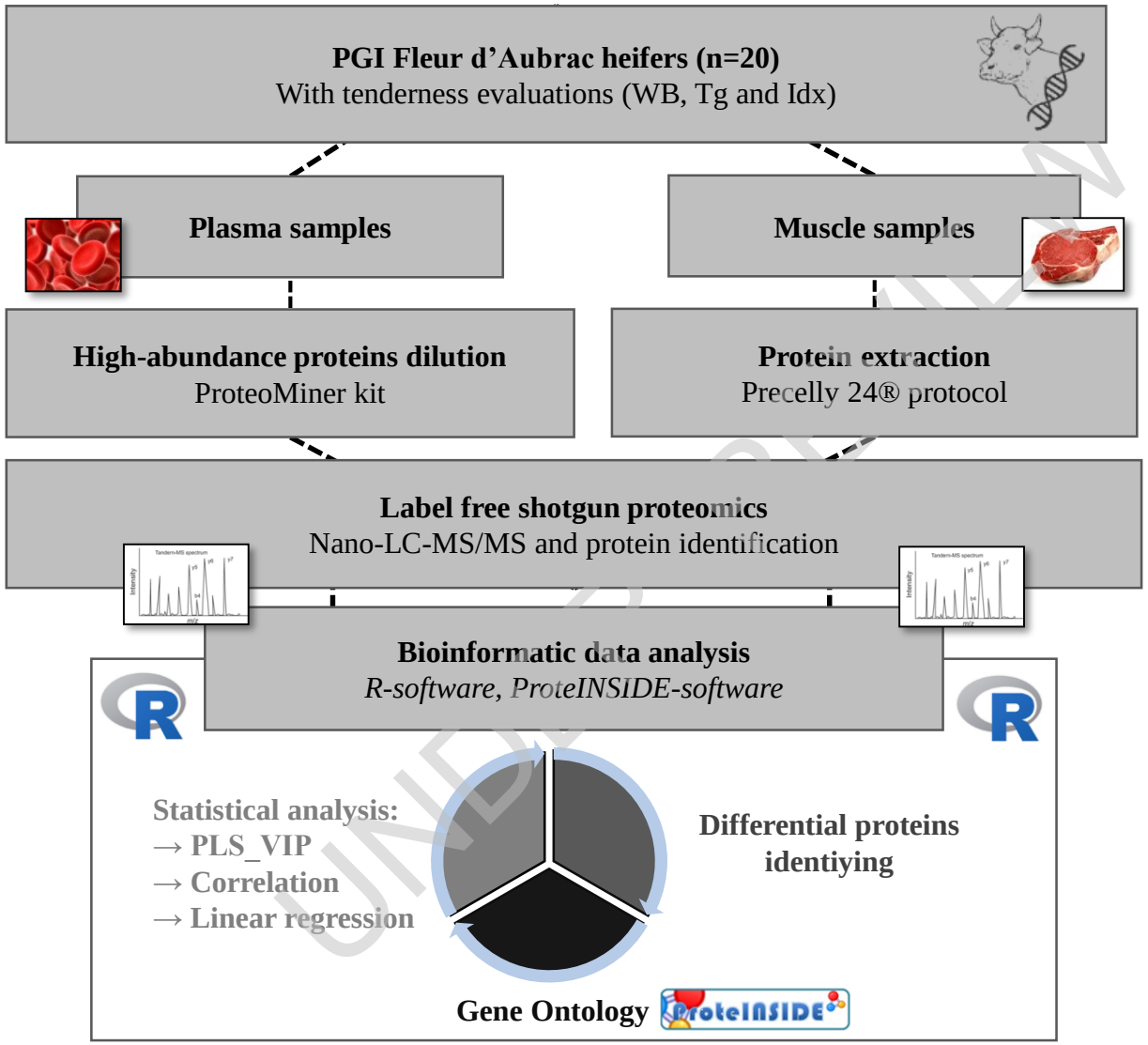
UNDER REVIEW

Table
Click here to download Table: Boudon et al_ Review_Mascot protein identification.xlsx

Differential proteins			WB P-value
Accession Number	**Gene Name**	**Full name**	
Muscle contraction and structure			
P68138	ACTA1	Actin, alpha skeletal muscle	1.35E-02
Q3ZC55	ACTN2	Alpha-actinin-2	
Q0III9	ACTN3	Alpha-actinin-3	4.71E-02
P79136	CAPZB	F-actin-capping protein subunit beta	
Q148F1	CFL2	Cofilin-2	
Q4U0T9	CSRP3	Cysteine and glycine-rich protein	2.90E-03
E1BE25	FLNC	Filamin-C	3.49E-02
A4FV78	KLHL41	Kelch-like protein 41	7.75E-03
G3X6W9	MYBPH	Myosin-binding protein H	
Q9BE40	MYH1	Myosin-1	
Q9BE39	MYH7	Myosin-7	3.22E-02
F1ME15	MYL2	Myosin regulatory light chain 2	3.93E-02
Q148H2	MYL6B	Myosin, light chain 6B	
E1BCU2	MYOM3	Myomesin-3	
F1MPU4	MYOT	Myotilin	
Q8SQ24	MYOZ1	Myozenin-1	2.37E-02
Q5E9V3	MYOZ2	Myozenin-2	
F1N0W6	MYOZ3	Myozenin-3	3.14E-02
A6H7E3	PDLIM1	PDZ and LIM domain 1	
Q3SX40	PDLIM7	PDZ and LIM domain protein 7	2.53E-02
E1BPV6	SMTNL1	Smoothelin-like protein 1	4.21E-02
A0JNC0	TMOD1	Tropomodulin-1	
P63315	TNNC1	Troponin C, slow skeletal and cardiac muscles	5.79E-03
Q8MKH7	TNNT3	Troponin T, fast skeletal muscle Tropomyosin	
Q5KR47	TPM3	alpha-3 chain	4.59E-02
F1N789	VCL	Vinculin	
Metabolism, transport and cell signalling			
A1L578	CAVIN1	Caveolae-associated protein 1	3.40E-02
Q32PH8	EEF1A2	Elongation factor 1-alpha 2 Elongation	2.44E-02
F1MG05	EEF1G	factor 1-gamma	
F1MR86	FHL1	Four and a half LIM domains protein 1	2.66E-02
A4FUZ1	GLO1	Lactoylglutathione lyase	
A1A4R1	HIST2H2AC	Histone H2A type 2	
Q17QE2	LMCD1	LIM and cysteine-rich domains protein 1	
Q32KP9	NUTF2	Nuclear transport factor 2	
Muscle energy metabolism			
P00570	AK1	Adenylate kinase isoenzyme 1	
P48644	ALDH1A1	Retinal dehydrogenase 1	
P20000	ALDH2	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	
A6QLL8	ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase Creatine	4.80E-02
F1MJT6	CKMT2	kinase S-type, mitochondrial Gamma-	
A6QR19	ENO2	enolase	

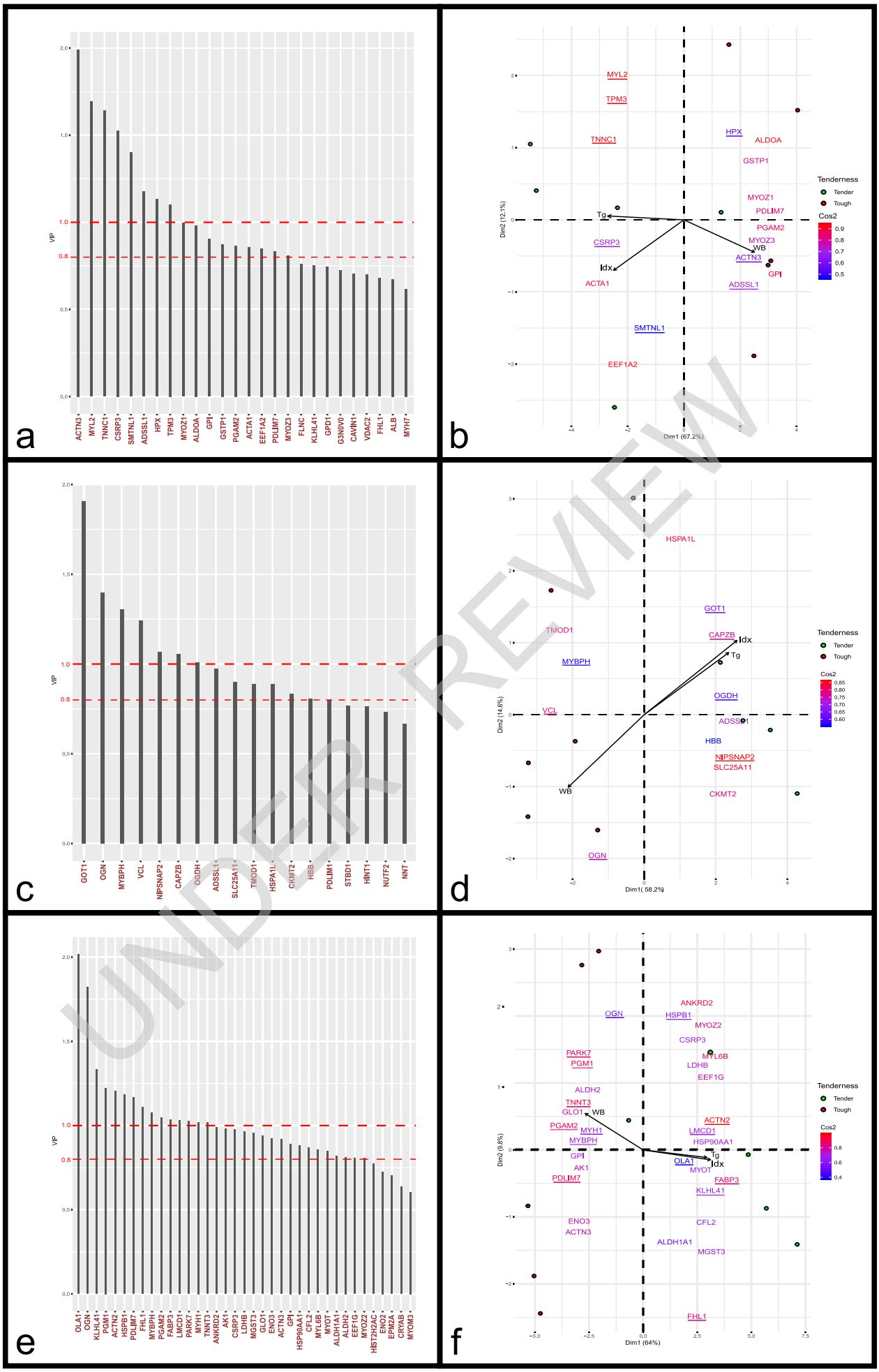
UNDER REVIEW

Figure
Click here to download Figure: Figure 1 Boudon and al.pdf



Figure

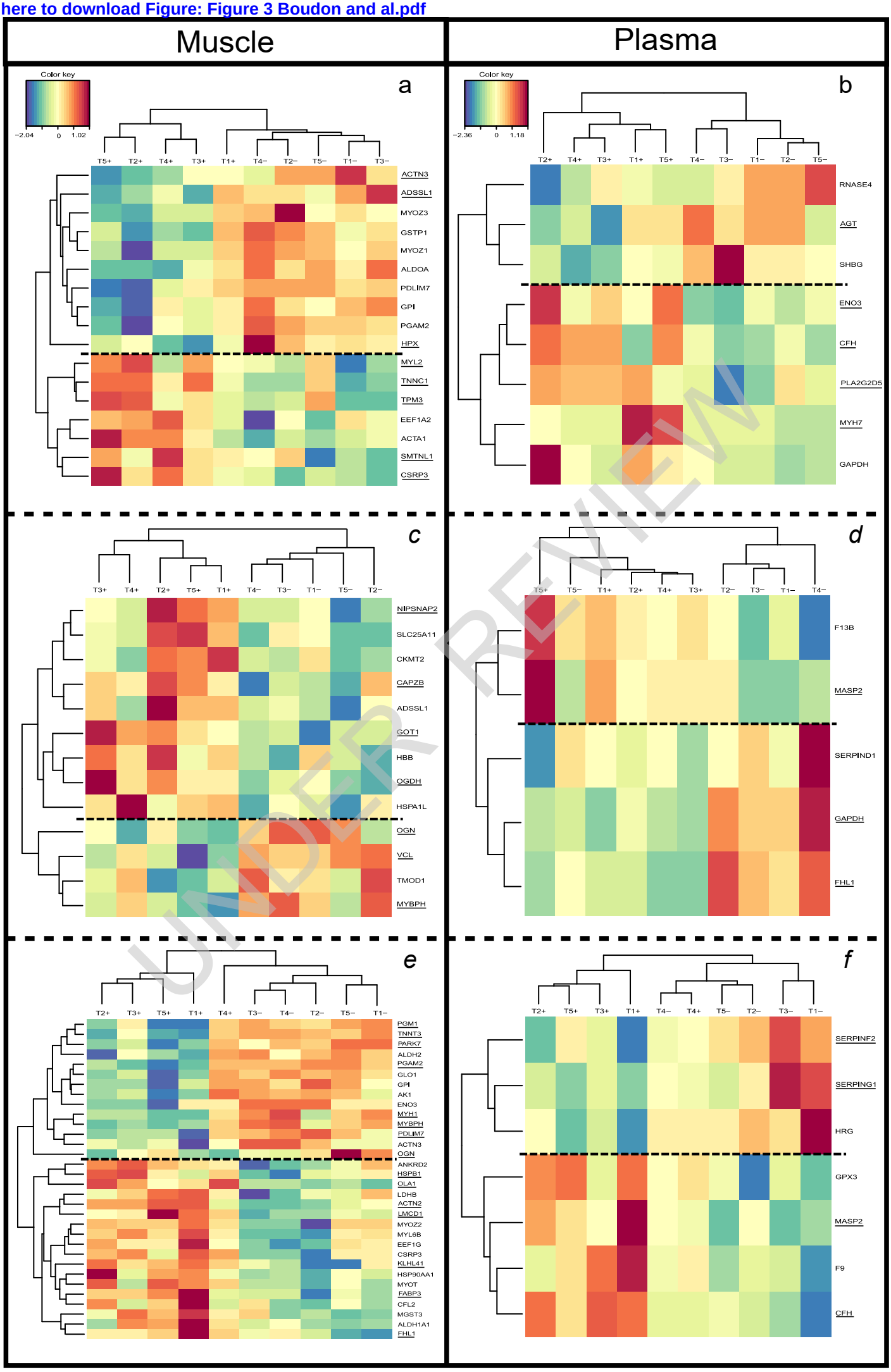
Click here to download Figure: Figure 2 Boudon and al.pdf



UNDER REVIEW

Figure

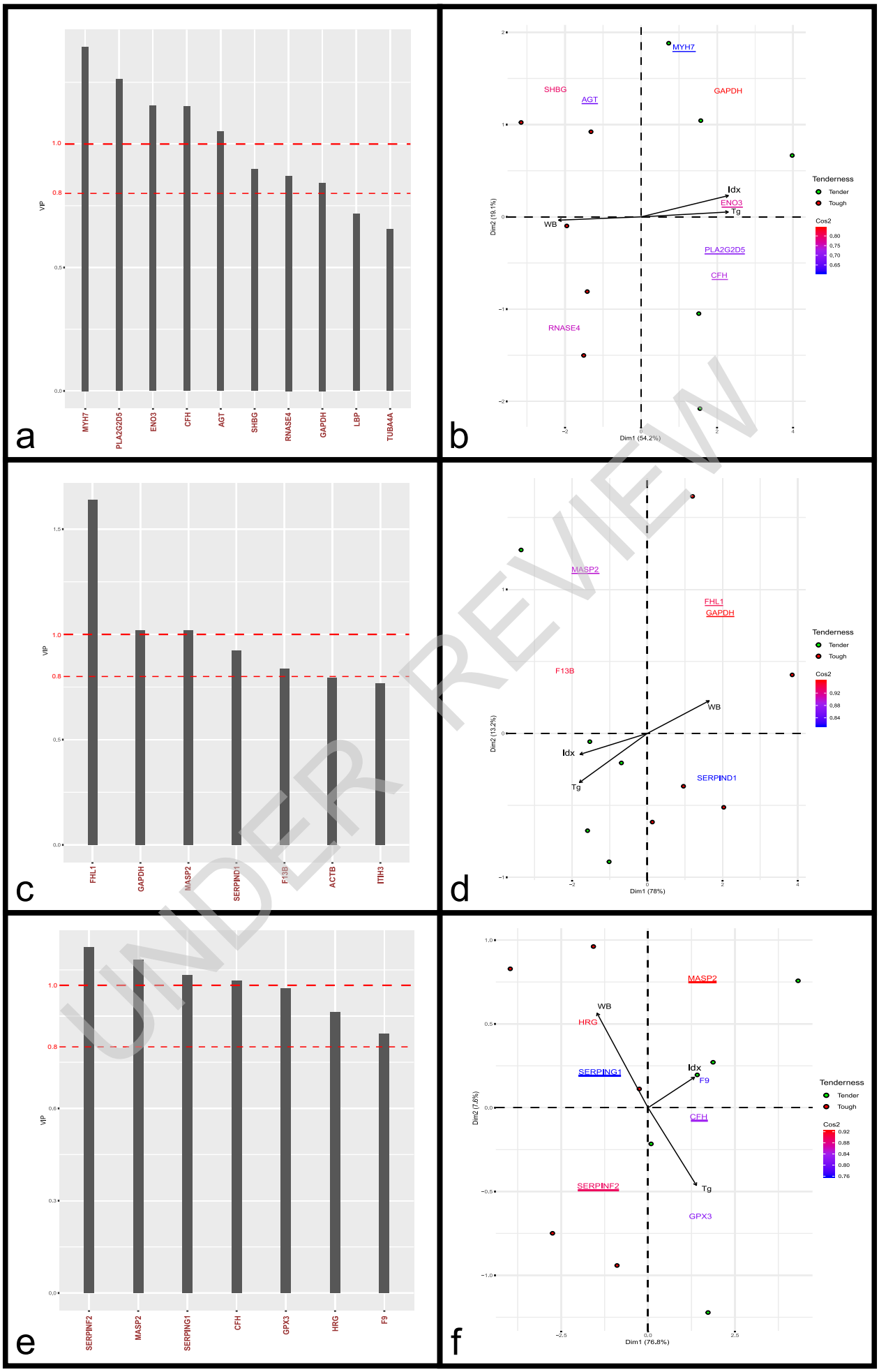
Click here to download Figure: Figure 3 Boudon and al.pdf



UNDER REVIEW

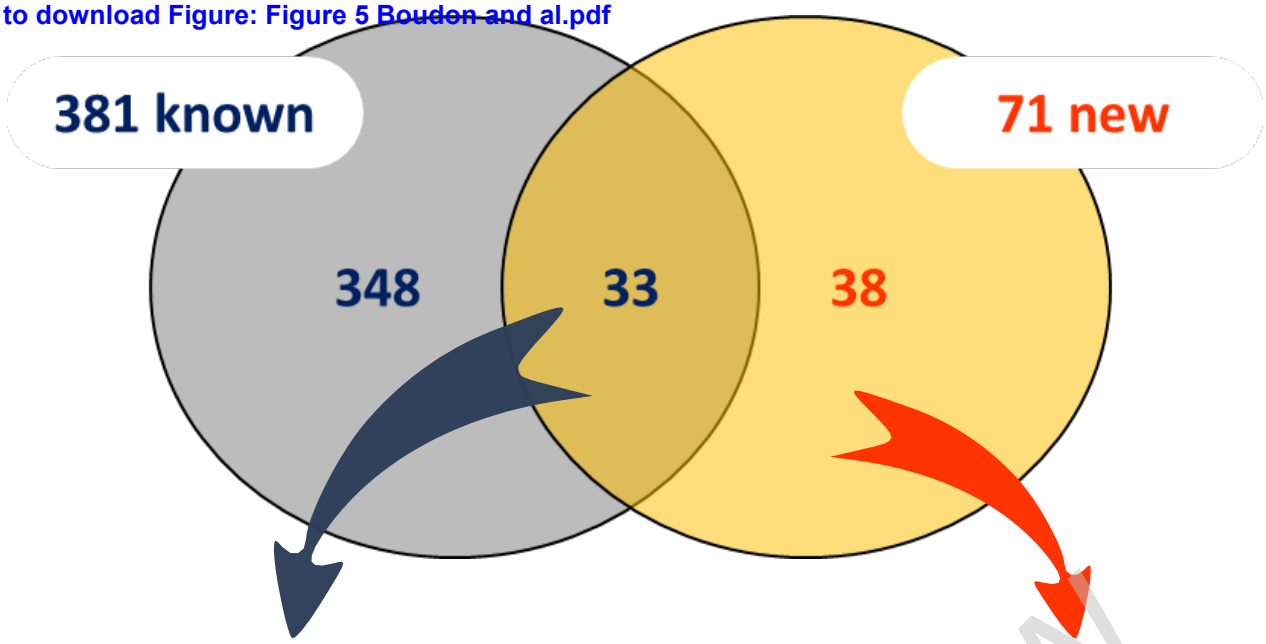
Figure

Click here to download Figure: Figure 4 Boudon and al.pdf



UNDER REVIEW

Figure
Click here to download Figure: Figure 5 Boudon and al.pdf



33 proteins reported in previous studies proteins	
Gene Name	QTL
Muscle contraction and structure	
ACTA1	
ACTN3	Tenderness score (Chr.29)
CAPZB	
CFL2	
CSRP3	Shear force (Chr.29)
KLHL41	
MYBPH	
MYH1	
MYH7	
MYL2	Shear force (Chr.17)
MYL6B	Shear force (Chr.5)
TNNT3	
TPM3	
Muscle energy metabolism	
AK1	
ALDH2	Shear force (Chr.17)
ALDOA	
CKMT2	Shear force (Chr.7)
ENO3	
FABP3	
GPD1	
LDHB	Shear force (Chr.5)
PGM1	Shear force (Chr.3)
PGAM2	
Metabolism, transport and cell signaling	
no protein	
Regulation of cellular process (apoptosis, oxidative stress)	
ALB	
ANKRD2	
CRYAB	
GSTP1	Tenderness score (Chr.29)
HBB	Shear force (Chr.15)
HINT1	
HSP90AA1	Shear force (Chr.21)
HSPB1	
PARK7	
VDAC2	Tenderness score (Chr.28)

38 new proteins	
Gene Name	QTL
Muscle contraction and structure	
ACTN2	
FLNC	
MYOM3	
MYOT	Shear force (Chr.7)
MYOZ1	
MYOZ2	
MYOZ3	Shear force (Chr.7)
PDLIM1	
PDLIM7	Shear force (Chr.7)
SMTNL1	
TMOD1	Shear force (Chr.8)
TNNC1	Shear force (Chr.22)
VCL	
Muscle energy metabolism	
ALDH1A1	Shear force (Chr.8)
ENO2	
GPI	
NIPSNAP2	
NNT	
OGDH	
OLA1	
SLC25A11	
Metabolism, transport and cell signaling	
CAVIN1	
EEF1A2	Shear force (Chr.13)
EEF1G	Tenderness score and Shear force (Chr.29)
FHL1	
GLO1	
HIST2H2AC	
LMCD1	
NUTF2	
Regulation of cellular process (apoptosis, oxidative stress)	
ADSSL1	
G3N0V0	
GOT1	
HPX	Shear force (Chr.15)
HSPA1L	
MGST3	
OGN	Shear force (Chr.8)
Autophagy	
EPM2A	Tenderness score (Chr.9)
STBD1	

UNDER REVIEW

Points clés de la publication 3

- L'analyse protéomique « Shotgun » a permis de compléter la liste des candidats de tendreté du muscle *Longissimus* déjà connus dans la littérature et identifiés principalement en 2-DE.
- De nouveaux biomarqueurs de tendreté du muscle *Longissimus* ont été identifiés pour la première fois chez des génisses.
- Des biomarqueurs de tendreté ont été identifiés pour la première fois dans le plasma.
- Les voies biologiques impliquées dans la tendreté des génisses sont similaires à celles révélées chez des taurillons.
- Les protéines FHL1, ENO3, MYH7 ont été identifiées comme biomarqueurs de tendreté quantifiables à la fois dans le plasma et dans le muscle *Longissimus*.

Publication 4

Analyse du proteome plasmatique et musculaire des animaux extrêmes classés selon la tendreté du muscle *Rectus abdominis*

Sabrina Boudon, Daoud Ounaissi, Didier Viala, Valérie Monteils, Brigitte Picard et Isabelle Cassar-Malek

En préparation

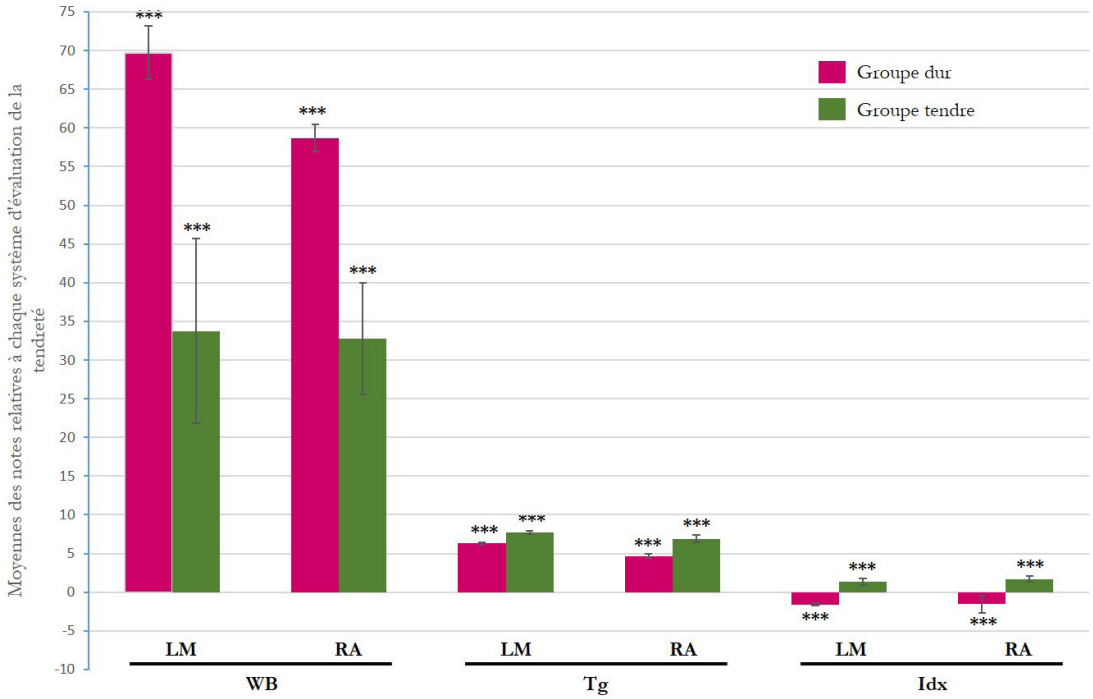


Figure 54. Appréciation de la tendreté des muscles *Longissimus* et *Rectus abdominis* issus de génisses IGP Fleur d'Aubrac

L'évaluation de la tendreté a été réalisée selon trois systèmes : Warner Bratzler (WB), sensoriel (Tg) et selon l'Index synthétique de tendreté (Idx). LM : *Longissimus*. RA : *Rectus abdominis*. *** : Significativité P<0,001.

	Muscle LM	Muscle RA	Effet muscle (P-value)
WB groupe tendre	3,37E+01 (± 3,47E+00)	3,27E+01 (± 1,70E+00)	1,51E-01
WB groupe dur	6,97E+01 (± 1,19E+01)	5,87E+01 (± 7,22E+00)	3,31E-03 (***)
Effet groupes extrêmes WB (P-value)	4,30E-04 (***)	2,67E-04 (***)	
Tg groupe tendre	7,72E+00 (± 1,57E-01)	6,92E+00 (± 2,97E-01)	1,82E-04 (***)
Tg groupe dur	6,31E+00 (± 2,47E-01)	4,68E+00 (± 5,00E-01)	1,33E-04 (***)
Effet groupes extrêmes Tg (P-value)	3,05E-06 (***)	6,53E-05 (***)	
Idx groupe tendre	1,37E+00 (± 1,51E-01)	1,69E+00 (± 1,10E+00)	4,36E-04 (***)
Idx groupe dur	-1,58E+00 (± 4,40E-01)	-1,55E+00 (± 3,76E-01)	4,72E-06 (***)
Effet groupes extrêmes Idx (P-value)	1,78E-05 (***)	3,15E-04 (***)	

Tableau 8. Comparaison des notes de tendreté déterminées selon trois systèmes d'évaluation (WB, Tg, Idx) pour les muscles *Longissimus* et *Rectus abdominis* de génisses Fleur d'Aubrac

Les moyennes des notes de tendreté sont déterminées à partir de groupes d'extrêmes définis sur les muscles LM et RA. Les écarts-type sont mentionnés entre parenthèses. *** : P-value<0,001 ; LM: *Longissimus* ; RA: *Rectus abdominis* ; WB: Warner Bratzler shear force, Tg: sensoriel ; Idx: Index synthétique de tendreté.

En parallèle de l'analyse protéomique réalisée pour le classement des animaux sur la tendreté du muscle LM, j'ai réalisé une analyse protéomique différentielle des échantillons de plasma et de muscle *Rectus abdominis* (RA) de groupes extrêmes de génisses classées selon la tendreté du RA. La même démarche que celle décrite pour le muscle LM a été appliquée ici. Deux groupes de tendreté dans le RA (dur/tendre, n=5 génisses par groupe) ont été établis. Comme pour le muscle LM, trois types d'évaluation de la tendreté ont été considérés : WB, Tg, Idx **(Figure 54)**.

Tendreté du muscle RA comparativement au muscle LM :

L'analyse de variance **(Tableau 8)** réalisée sur les groupes de tendreté évalués par la force de cisaillement WB ne montre pas de différence significative entre les groupes tendres identifiés à partir du muscle RA et les groupes tendres identifiés à partir du muscle LM (P-value= 1,51E-01). Par contre, pour les groupes durs de ces mêmes muscles, on observe une différence significative (P-value= 3,31E-03), la moyenne du groupe dur du LM étant supérieure à celle du RA. De plus, on observe une variabilité de la tendreté intra-groupe plus importante au sein des groupes « durs » LM (Ecart-type= 1,19E+01) par rapport au muscle RA (Ecart-type= 7,22E+00), et dans une moindre mesure au sein des groupes « tendres » LM (Ecart-type=3,47E+00) par rapport au muscle RA (Ecart-type=1,70E+00). Ainsi, la variabilité du muscle RA est moindre que celle du muscle LM. L'écart entre les deux groupes extrêmes (durs/tendres) est plus faible pour le muscle RA que pour le LM.

L'analyse de variance réalisée à partir des notes de tendreté évaluées pas l'analyse sensorielle Tg **(Tableau 8)** montre également que les notes du groupe dur pour le LM sont significativement plus élevées que celles du RA (P-value= 1,82E-04). Contrairement aux notes de WB, on observe également que les notes de Tg du groupe dur du LM sont significativement supérieures à celles du RA (P-value= 1,33E-04), ce qui est en accord avec les mesures mécaniques. Ainsi, l'analyse sensorielle, réalisée par un jury de dégustation entraîné, a permis de mettre en évidence une différence plus marquée entre ces deux muscles qu'avec la mesure mécanique WB. Ces résultats suggèrent que l'analyse sensorielle pourrait prendre en compte des paramètres particuliers (ex : la teneur en collagène, sa solubilité, le type de fibre,…) perçus par le jury de dégustation et non évalués lors de la mesure mécanique. La comparaison des résultats obtenus par l'analyse mécanique WB et par l'analyse sensorielle Tg confirme qu'il existe des différences de perception de la tendreté selon l'utilisation d'une évaluation objective (analyse mécanique, WB) ou plus subjective (jury de dégustation, Tg). C'est la raison pour laquelle nous avons choisi d'utiliser un indice « synthétique » de la tendreté (Index ou Idx) qui prend en compte ces deux critères d'évaluation de la

tendreté (formule pour calculer l'Idx en **Figure 53**). L'index apporte une valeur ajoutée à l'estimation de la tendreté car il permet de combiner la mesure mécanique et sensorielle et ainsi d'évaluer de manière plus précise le phénotype tendreté. Cet Idx a été utilisé dans la littérature pour plusieurs études traitant de la tendreté de la viande bovine [Chaze et al., 2013 ; Picard et al., 2014].

L'analyse de variance **(Tableau 8)** réalisée sur les groupes de tendreté évalués par l'index de tendreté Idx montre des résultats similaires à ceux observés pour la tendreté sensorielle Tg. En effet, l'analyse des groupes tendres montre que le muscle LM est significativement plus tendre que le muscle RA (P-value= 4,36E-04) alors que l'analyse des groupes durs montre que le muscle RA est significativement plus dur que le muscle LM (P-value= 4,72E-06). Aussi, la variabilité de la tendreté intra-groupe est plus importante au sein des groupes « durs » LM (Ecart-type± 4,40E-01) par rapport au muscle RA (Ecart-type± 3,76E-01), alors qu'elle est plus importante au sein des groupes « tendres » RA (Ecart-type= ± 1,10E+00) qu'au sein du muscle LM (Ecart-type ± 1,51E-01).

Identification des protéines musculaires et plasmatiques qui discriminent les groupes contrastés pour la tendreté du muscle RA :

L'analyse protéomique des échantillons de muscle RA combinée à une analyse de variance entre les groupes de tendreté extrême a permis d'identifier 9 protéines (ANKRD2, ATP2A2, TNNI2, TNNT3, TPM1, RDX, SLC25A4, HBB et DUSP3) différentiellement abondantes. Parmi ces 9 protéines, 5 protéines (TNNT3, RDX, SLC25A4, HBB et DUSP3) discriminent spécifiquement les groupes de tendreté sur la base de la mesure mécanique WB, 1 protéine (ANKRD2) discrimine spécifiquement les groupes sur la base de l'évaluation sensorielle Tg et 3 protéines (ATP2A2, TNNI2 et TPM1) discriminent spécifiquement les groupes définis sur l'index de tendreté Idx. Aucune protéine différentielle n'est commune aux trois systèmes d'évaluation WB, Tg et Idx.

L'analyse protéomique des échantillons de plasma des groupes extrêmes en tendreté pour le RA a permis d'identifier 11 protéines (APOD, G3MXB5 (Ig-like protein), ACTB, C4BP, PRDX2, PROC, F7, LOC790886, GC, THBS1 et CGN1) comme discriminantes des groupes de tendreté définis pour le muscle RA. Parmi ces 11 protéines, 9 protéines (APOD, G3MXB5 (Ig-like protein), ACTB, C4BP, PRDX2, PROC, F7, LOC790886, GC) discriminent spécifiquement les groupes de tendreté sur la base de la mesure mécanique WB, 1 protéine (THBS1) discrimine spécifiquement les groupes de tendreté sur la base de l'évaluation sensorielle Tg et 3 protéines (ATP2A2, TNNI2 et TPM1) discriminent

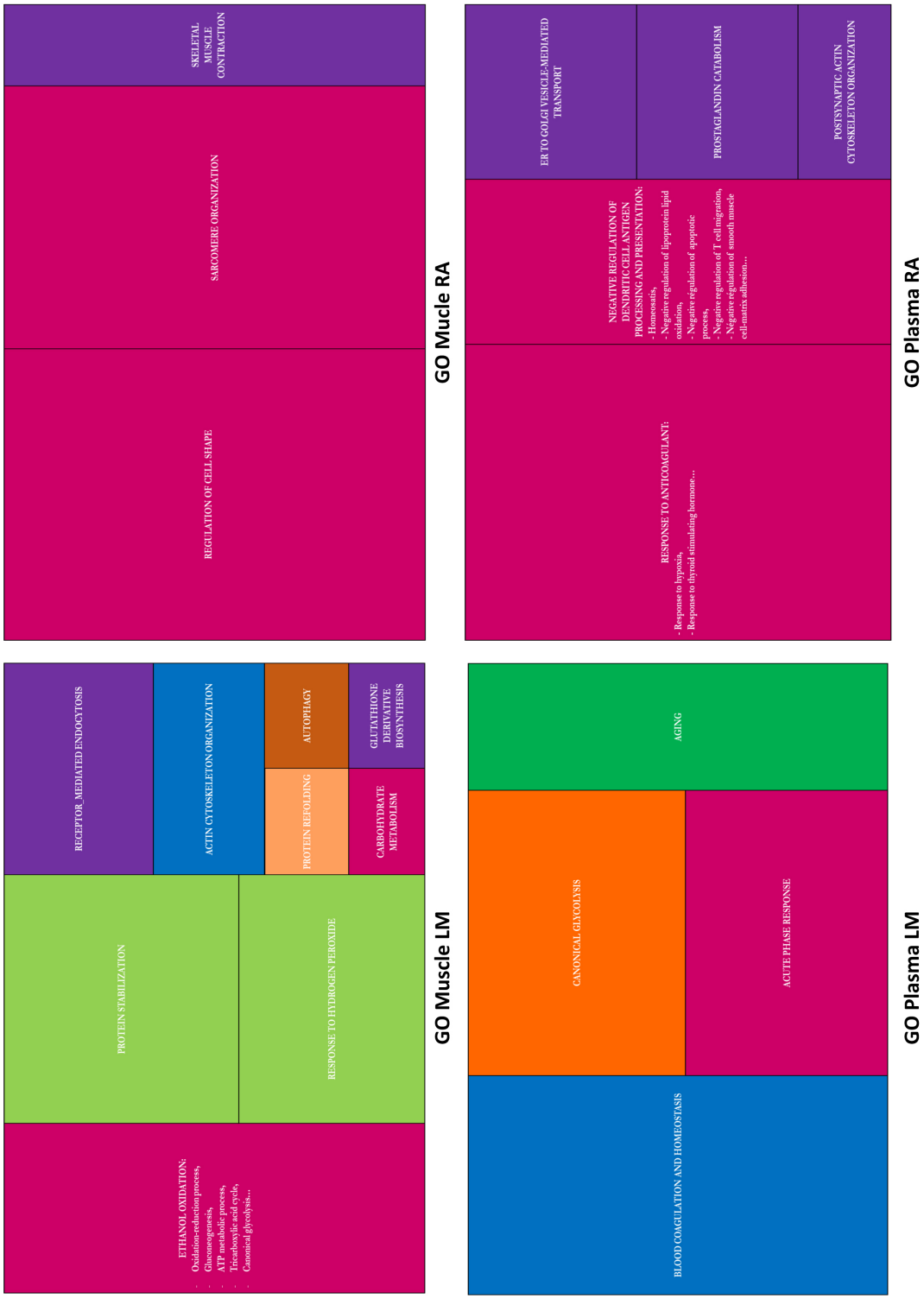


Figure 55. Gene Ontology des protéines différentielles identifiées dans les échantillons musculaires et plasmatiques des génisses IGP Fleur d'Aubrac.

Représentation visuelle de la classification sémantique ("TreeMap") de REVIGO. Chaque rectangle représente un cluster unique. Les termes GO représentés sont les termes majeurs. Ils regroupent des termes mineurs en « grande famille ». Chaque « grande famille » de termes GO est visualisée par une couleur. La taille des rectangles a été ajustée pour refléter la valeur de la p-value ajustée issue de l'analyse de Gene Ontology dans ProteINSIDE (P>0.001). La GO « Biological Process » des muscles LM et RA est représentée en haut. La GO des plasmas_LM et plasmas_RA est représentée en bas. Le détail des regroupements des termes de GO issues de REVIGO est accessible en Annexes 1 à 4.

spécifiquement les groupes de tendreté grâce à l'index de tendreté Idx. Une protéine (PRDX2) est différentielle à la fois pour WB et Idx.

Des signatures protéomiques qui illustrent des mécanismes de tendreté différents selon les muscles ?

Bien que les notes de tendreté soient du même ordre dans les deux muscles, les protéines candidates identifiées pour chacun d'entre eux par l'analyse protéomique sont différentes. L'analyse protéomique du muscle RA a mis en en évidence peu de protéines dont l'abondance diffère entre groupes extrêmes de tendreté, comparativement au muscle LM. Ce faible nombre n'a pas permis d'effectuer une analyse statistique aussi approfondie que celle réalisée pour le muscle LM (ACP, PLS_DA, Heatmap, régression linéaire). Les protéines différentielles identifiées pour le muscle RA sont essentiellement détectées en relation avec la mesure mécanique WB. Ceci permet de proposer l'hypothèse que le déterminisme de la tendreté du muscle RA serait associé plus particulièrement à des protéines impliquées dans les propriétés mécaniques du muscle comme des protéines de structure et d'ultrastructure du muscle, de la trame conjonctive et la matrice extracellulaire.

L'analyse de la Gene Ontology des 9 protéines différentielles dans le muscle RA confirme bien que les protéines musculaires identifiées sont impliquées dans la structure, l'ultrastructure ainsi que la contraction musculaire et sa régulation **(Figure 55, Annexe 1)**, plutôt que dans le métabolisme énergétique du muscle, l'apoptose, l'autophagie ou d'autres régulations *post-mortem* comme dans le muscle LM **(Publication 3, Figure 55, Annexe 2)**. Nous pouvons émettre l'hypothèse que la technique protéomique que nous avons utilisé, ne cible pas, ou que très peu, les protéines liées à la tendreté du muscle RA. Il est possible que des protéines importantes pour la tendreté dans ce muscle aient été faiblement extraites lors de la préparation des échantillons (mauvaise solubilisation des protéines de la trame conjonctive et de la matrice extracellulaire, par exemple). Ceci reste à vérifier, en appliquant des techniques plus adaptées à l'extraction des protéines de la matrice extracellulaire (matrisome), susceptibles d'être impliquées dans des mécanismes mis en jeu dans la tendreté du muscle RA.

Pour le plasma, la comparaison des résultats obtenus selon le classement sur la tendreté dans le LM ou le RA, montre aussi des différences entre les signatures protéiques plasmatiques associées à la tendreté de ces muscles. Selon le muscle utilisé pour classer les animaux sur leur tendreté, il ressort comme précédemment des voies biologiques différentes en lien avec la tendreté. Les voies biologiques associées aux 11 protéines différentielles identifiées dans le plasma_RA sont essentiellement reliées à la coagulation,

le métabolisme lipidique, le transport vésiculaire et l'apoptose (**Figure 55, Annexe 3)**, alors que les voies biologiques associées aux 21 protéines différentielles identifiées à partir du plasma LM sont plutôt reliées à la coagulation et au métabolisme glycolytique **(Publication 3, Figure 55, Annexe 4)**. Cela reflète encore les différences dans les mécanismes de tendreté entre le muscle RA et le LM.

La comparaison des listes de protéines différentielles associées aux deux muscles montre cependant l'existence de 2 protéines musculaires communes au niveau musculaire (HBB et TNNT3), dont 1 est comprise dans un QTL de qualité (HBB, QTL Shear force, Chr.15). La protéine ACTB, identifiée comme différentielle dans le plasma et associée avec la tendreté des deux muscles LM et RA apparait comme une protéine candidate de choix pour être « générique ». Cette protéine pourrait être testée sur un plus grand panel d'individus (ex : les 66 génisses Fleur d'Aubrac) pour lesquels nous disposons d'échantillons plasmatiques.

Analyse comparative entre l'analyse protéomique musculaire du muscle RA et la base de données issues de la revue systématique de la littérature :

L'analyse comparative des 9 protéines musculaires identifiées par l'approche protéomique avec les données publiées dans la littérature (n=469, [Boudon and Cassar-Malek, 2019]; et 61 protéines, [Picard and Gagaoua, 2020]) pour le muscle *Longissimus* permet d'identifier 3 protéines spécifiques du muscle RA (DUSP, SLC25A4 et ANKRD2). L'abondance de la protéine DUSP3 (pour l'anglais « Dual specificity protein phosphatase) » a été rapportée comme diminuée chez des souris invalidées pour le gènes *HSPB1* codant la protéine HSP27 (analyse protéomique 2-DE) [Picard et al., 2016]. Plusieurs études ont montré que HSP27 est associée à la tendreté, dans les muscles LT et ST, et chez plusieurs types de bovins (pour synthèse [Picard and Gagaoua, 2020]). Ceci renforce l'intérêt potentiel de la protéine DUSP3, retrouvée dans cette étude (abondance augmentée dans muscles tendres RA évalués selon la WB, comme un candidat d'intérêt pour prédire la tendreté. Le gène codant la radixine (RDX), une protéine de liaison à l'actine, a été rapportée comme up-régulé dans les muscles tendres *Longissimus thoracis* et *lumborum* de porc [Hamill et al., 2012], suggérant l'intérêt de cette protéine comme un potentiel biomarqueur de tendreté chez le bovin. La protéine SLC25A4, protéine impliquée dans la mise en place de pore de transition lors de la perméabilité mitochondriale (MPTP, pour l'anglais « Mitochondrial permeability transition pore », a été rapportée comme acétylée/desacétylée dans le muscle *post-mortem* de porc [Jiang et al., 2019]. Les MPTP, responsables du relargage de composés pro-apototiques mitochondriaux (ex : cytochrome c), sont impliquées dans le processus d'initiation de l'apoptose [Morganti et al., 2018]. Cette voie ayant été

décrite comme associée au déterminisme de la tendreté dans de nombreuses études [Picard and Gagaoua, 2020], la protéine SLC25A4 présente ainsi un intérêt particulier comme biomarqueur et pour la prédiction de la tendreté de la viande. Enfin, l'Ankyrin repeat domain 2 (ANKRD2), impliquée dans l'hypertrophie musculaire et dans la réponse au stress oxydant dans le muscle strié [Kojic et al., 2004; Cenni et al., 2019], a été proposée comme une protéine candidate pour évaluer la tendreté des muscle *Longissimus thoracis* de vaches AOP Maine-Anjou.

Points clés de l'étude du muscle RA

- 9 protéines candidates pour évaluer la tendreté du muscle *Rectus abdominis* (RA) ont été identifiées pour la première fois chez des génisses : ANKRD2, ATP2A2, TNNI2, TNNR3, TPM1, RDX, SLC25A4, HBB et DUSP3
- 11 protéines candidates associées à la tendreté du muscle RA ont été identifiées pour la première fois dans le plasma : APOD, G3MXB5, ACTB, C4BP, PRDX2, PROC, F7, LOC790886, GC, THBS1 et CGN1
- Les voies biologiques associées au déterminisme de la tendreté du muscle RA reflèteraient des mécanismes spécifiques à ce muscle. Parmi les protéines différentielles identifiées, 3 protéines (DUSP3, RDX et SLC4A) semblent spécifiques du muscle RA
- Parmi les protéines identifiées, 4 ont un caractère « générique » :
  - Les candidats musculaires ANKRD2, HBB et TNNT3 sont communs aux muscles LM et RA
  - Le candidat plasmatique ACTB est commun aux plasmas associés à la tendreté des muscles LM et RA.

Discussion générale

Discussion générale

La tendreté de la viande bovine, l'une des qualités sensorielles les plus recherchées par les consommateurs, reste aujourd'hui une qualité très complexe, source d'une grande variabilité non-maîtrisée. Cette grande variabilité peut s'expliquer par les particularités relatives aux différents muscles, types d'animaux et races bovines. Ce n'est pas étonnant si on considère que, depuis la domestication, il y a plus de 10 000 ans, certaines races ou certains types d'animaux ont été sélectionnés pour répondre aux besoins de l'Homme : production de lait, de viande, avec des capacités d'adaptation au froid et/ou aux fluctuations des ressources alimentaires (races de type « rustiques »), à la chaleur ou aux parasites [Diamond, 2002]. Ainsi, cette sélection a conduit à générer des lignées divergentes, à l'origine les races actuelles dont les profils d'expression protéique sont différents [Dujon and Pelletier, 2019].

La synthèse bibliographique présentée au début de ce manuscrit a permis de mettre en lumière la complexité des mécanismes biologiques impliqués dans la mise en place (transformation *post-mortem*) et dans le déterminisme de la tendreté, ainsi que les marqueurs moléculaires associés. Elle a illustré aussi les variabilités inter- et intra- individuelles de ces marqueurs selon le type de muscle étudié ou les conditions d'élevage. L'hypothèse à la base de mon travail de thèse était que l'analyse des signatures moléculaires associées à la tendreté pourrait permettre de découvrir des biomarqueurs génériques pour phénotyper les animaux sur leur « potentiel tendreté » ou prédire ce potentiel au cours de la phase d'élevage. L'objectif de mes travaux de thèse était d'identifier des marqueurs peu-invasifs dont l'utilisation du vivant de l'animal permettrait d'évaluer ou de prédire précocement ce « potentiel ».

Pour répondre à cet objectif, l'originalité de ce travail de thèse a consisté à combiner deux approches : (i) une approche *in silico* avec la reconstruction du sécrétome associé aux signatures moléculaires publiées de la tendreté et (ii) une analyse du protéome (plasma, muscle) associé à la tendreté. Du fait de leur complémentarité, ces deux approches devaient me permettre (i) de découvrir des candidats pour être des biomarqueurs plasmatiques et (ii) d'apporter des connaissances supplémentaires sur les mécanismes de tendreté. Mon travail de thèse a répondu à ce double objectif en analysant *in silico* les voies biologiques associées au déterminisme de la tendreté et en proposant pour la première fois les voies de sécrétions vésiculaires (VEs, exosomes) et cils primaires comme des mécanismes de sécrétion en lien avec la tendreté de la viande bovine. Utilisée pour la première fois dans ce domaine d'étude, l'analyse

protéomique « Shotgun » a également permis de (i) découvrir des protéines plasmatiques dont l'abondance est associée à la tendreté ; (ii) de compléter la liste de biomarqueurs musculaires connus pour le muscle *Longissimus* (entrecôte) avec 38 nouveaux candidats (iii) de proposer pour la première fois 9 candidats pour le muscle *Rectus abdominis* (bavette de flanchet). Enfin, l'ensemble de mes travaux *in silico* et expérimentaux me permet de proposer pour la première fois une liste de 107 marqueurs plasmatiques candidats pour évaluer la tendreté de la viande bovine.

I. L'approche *in silico*, une démarche originale pour la découverte de biomarqueurs de tendreté

Comme indiqué dans la synthèse bibliographique, des études réalisées dans plusieurs laboratoires internationaux ont analysé les signatures moléculaires (biochimiques et omiques) en lien avec la tendreté de la viande bovine. Un gisement de données publiques était donc disponible au début de ce travail pour commencer à explorer l'hypothèse de la présence potentielle, dans le plasma, de protéines en lien avec la tendreté. Tout d'abord, l'analyse intégrative de données publiques agrégées au travers d'une revue systématique de la littérature m'a permis de confirmer les mécanismes biologiques décrits comme mis en jeu dans le déterminisme de la tendreté. Cette étape validait la construction de la base de données agrégées. Cette analyse *in silico* complète une étude récente qui répertorie ces mêmes voies à l'issue d'une revue de 12 expérimentations protéomiques (stratégie 2-DE couplée à la spectrométrie de masse) menées sur deux muscles (*Longissimus thoracis* (LT) et *Semitendinosus* (ST)), issus de différents types de bovins (jeunes taurillons, bouvillons, vaches), et de différentes races (Charolaise, Limousine, Blonde d'Aquitaine, Salers, AOP Maine-Anjou) [Picard and Gagaoua, 2020]. Mon travail de thèse est complémentaire de cette étude, car la base de données que j'ai construite est un répertoire issu de données protéomiques mais aussi de données de transcriptomique et de génétique [Boudon and Cassar-Malek, 2019] qui m'a permis d'élaborer une liste de protéines associées à la tendreté.

Afin de découvrir des candidats peu-invasifs en lien avec la tendreté de la viande, j'ai fait le choix de reconstruire le sécrétome à partir de cette liste. Il s'agissait de prédire les protéines sécrétées à l'aide de l'outil ProteINSIDE et de rechercher parmi elles lesquelles étaient retrouvées dans un répertoire de protéines plasmatiques bovines. A l'issue de ce travail, je propose pour la première fois un répertoire de 75 candidats plasmatiques reliés à la tendreté de la viande **(Tableau 7)**. Ce sécrétome représente 11,5% du répertoire initial, ce qui est cohérent avec la littérature sur les sécrétomes [Caccia et al., 2013; Keerthikumar, 2016]. L'examen des voies de sécrétion a été à la base d'une hypothèse selon laquelle les

voies non-conventionnelles (ou UPS) pourraient être mobilisées dans et/ou associées avec les mécanismes de tendreté. Parmi les protéines identifiées, environ 1/4 sont prédites comme sécrétées au travers de voies conventionnelles de sécrétion (présence de Signal-P et/ou de domaine transmembranaire) mais la majorité semble être sécrétées par des voies alternatives. J'ai formulé l'hypothèse que ces voies sont des voies de secrétions vésiculaires (micro-vésicules (VEs) et/ou exosomes). Ceci m'a conduite à comparer les protéines dont la sécrétion n'était pas prédite, mais qui étaient présentes dans le répertoire de plasma, avec des atlas non-exhaustifs de protéines micro-vésiculaires ou exosomales. Ces protéines « hypothétiquement sécrétées dans le plasma » sont principalement des protéines en lien avec le cytoplasme et les voies contractiles et métaboliques (contraction musculaire, protéine de stabilisation, repliement protéique chaperonne, métabolisme glucidique et endocytose). Les voies vésiculaires étant reliées à des mécanismes d'endocytose et d'exocytose [Roma Pharmacy, 2019], ces résultats sont en accord avec mon hypothèse. Les protéines VEs et exosomales sont identifiées comme des sous-répertoires de protéines sécrétées dans le plasma (36%). La littérature indique que les VEs, en tant qu'intégrateurs physiologiques, et en réponse à des signaux qui altèrent l'homéostasie cellulaire, sont une source de biomarqueurs. Ces vésicules jouent notamment un rôle crucial pour le dialogue entre le muscle et les autres tissus et organes [Colombo et al., 2014; Sun et al., 2013b], ce qui les positionne comme de nouveaux médiateurs de la communication tissus/organes. Par exemple, les VEs ont été identifiées comme impliquées dans un nouveau mécanisme de sécrétion de myokines [Whitham et al., 2018]. Elles pourraient donc assurer la communication dans des situations particulières. On peut imaginer que ces vésicules seraient un moyen de compenser l'altération du métabolisme/des ressources énergétiques en situation d'hypoxie (stress) ou d'anoxie (abattage) indépendamment du métabolisme musculaire préexistant. Des unités métaboliques mobiles pour suppléer le métabolisme du muscle à la mort de l'animal, avec des conséquences sur la transformation du muscle en viande. C'est la première fois que les VEs et exosomes sont retrouvées en lien avec la tendreté. Toutefois, le transcrit EXOSC2, qui code le composant 2 de l'exosome, a été retrouvé plus abondant dans des muscles *Longissimus dorsi* de bovins Nellore donnant une viande plus tendre [Fonseca et al., 2017]. Ce transcrit est en lien avec le collagène, qui joue un rôle important dans le déterminisme de la dureté de base de la viande. D'autres auteurs ont rapporté que des exosomes issus de cellules endothéliales en conditions d'hypoxie se lient à la matrice extracellulaire en lien avec une activité Lysyloxydase like 2 (LOXL2) augmentée [De Jong et al., 2016]. Or, un allèle du gène LOX a été proposé comme marqueur génétique [Barendse, 2002] et LOXL2 est identifié comme gène candidat pour la qualité

chez le bovin [Sorbolini et al., 2015]. Enfin, la protéine GAPDH est retrouvée à la fois dans les protéines de VEs et les protéines exosomales dans le plasma. Elle avait déjà été identifiée chez l'Homme dans les VEs au cours de l'exercice physique [Whitham et al., 2018].

Bien que ce type d'approche *in silico* ait fait ses preuves pour identifier des sécrétomes tissulaires à partir du protéome Humain et pour révéler les mécanismes moléculaires dans lesquels ces sécrétomes sont impliqués [Keerthikumar, 2016], une telle approche dans le domaine agronomique, pour l'identification de biomarqueurs de la qualité de la viande peu-invasifs, reste précurseuse. Une étude récente de l'équipe avait initié cette démarche en analysant le sécrétome musculaire et celui du tissu adipeux pour identifier des molécules qui pourraient contribuer au dialogue tissulaire [Bonnet et al., 2016]. D'autre part, parmi les 75 protéines identifiées dans cette étude, 24 protéines sont associées à des QTL de qualité de viande bovine (ATP2A2, ACTC1, HBB, HSP90AA1, LAMC1, LDHA, LDHB, PPARG, PVALB, TPM1, CASP8AP2, ACTN1, CAT, CCNB2, CFL1, GSS, MAPK1, NEFL, PRKACB, PSMA7, USP8, YWHAB, YWHAZ et ZBTB21). Ainsi, ces protéines apparaissent comme des candidats pertinents à explorer pour évaluer ou prédire la tendreté de la viande bovine dans le plasma.

Au cours de mon étude, la réutilisation de données publiques, qu'elles soient protéomiques, transcriptomiques ou génétiques, a présenté plusieurs limites. La gestion de milliers de données liées à des différentiels d'abondance protéique, d'expression de gènes et de transcrits a nécessité d'homogénéiser les données avant de les analyser ensemble. Le format des identifiants (ID) publiés par les auteurs des articles sélectionnés était très différent en raison de la diversité des données agrégées (données protéomiques, transcriptomiques et génétiques) et des techniques utilisées (puces ADN, RNAseq, 2-DE, Dot-blot, microarray, LC-MS/MS…). Les annotations de Gene Ontology (GO) chez le bovin étaient limitées, aussi nous avons fait le choix d'utiliser les ID Gene Name comme identifiants uniques afin de pouvoir enrichir les annotations avec les orthologues Humains et permettre une meilleure interprétation des résultats. Afin d'éviter les biais d'annotations pour les isoformes protéiques, l'ensemble des ID Gene Names d'isoformes ont été vérifiés afin de contrôler l'exactitude entre les peptides identifiés et l'ID Gene Name qui lui est associé. Une autre limite de ce travail a été de ne pas disposer de la totalité des données quantitatives relatives à chacun des jeux de données de la base. C'est pourquoi, nous avons choisi de procéder plutôt à une revue systématique de données de la littérature. Le recensement des données quantitatives aurait permis de réaliser une méta-analyse, c'est-à-dire une exploitation de ces données par une méthodologie statistique afin de sélectionner les candidats biomarqueurs, comme récemment réalisé

dans l'équipe au cours de la thèse de J. Bazile [Bazile, 2019] pour la recherche de biomarqueurs d'adiposité.

II. Les apports de l'approche expérimentale pour la découverte de biomarqueurs de tendreté

Pour faire suite à l'analyse *in silico*, nous avons analysé le protéome de plasma dans un dispositif bovin correspondant à des génisses IGP Fleur d'Aubrac, inscrites dans un programme de valorisation de filière visant à promouvoir les produits régionaux de haute qualité dans le Massif-Central (Collaboration avec B. Picard et V. Monteils). Ce dispositif, dans lequel le laboratoire avait recueilli diverses informations dont la qualité de la viande (thèse de J. Soulat, [Soulat, 2017]) et constitué une échantillothèque de plasmas pendant la phase d'élevage, était bien adapté pour la découverte de biomarqueurs plasmatiques, et pour rechercher une relation entre signatures protéomiques plasmatiques et musculaires.

1. L'étude du protéome plasmatique

L'analyse protéomique du plasma en lien avec la tendreté des muscles LM et RA avait pour but d'identifier des protéines plasmatiques, différentielles entre des groupes d'individus contrastés pour la tendreté de leur viande. Dans un premier temps, il a fallu faire des choix : analyser un nombre restreint d'animaux extrêmes, définir les échantillons à analyser en fonction du classement des animaux sur la tendreté de leur viande selon qu'elle était issue de LM ou de RA. L'analyse protéomique des plasmas classés selon la tendreté de leur LM (« plasma_LM ») et de leur RA (« plasma_RA ») a permis d'identifier respectivement 21 et 11 protéines différentiellement abondantes. Ce nombre peu élevé est surprenant au regard des 22 000 gènes qui constituent le génome bovin [Burt, 2009], ou les 1101 protéines constituant le répertoire de plasma bovin (Bonnet et al, 2016). Plusieurs interprétations liées aux étapes préparatoires de l'analyse protéomique peuvent être avancées pour expliquer le nombre peu élevé de protéines plasmatiques détectées dans notre étude (n=136 validées par au moins 2 peptides en MS) : (i) la concentration des protéines sur gel d'électrophorèse suivie de l'excision de bandes protéiques, et (ii) l'élimination des protéines majoritaires du plasma expliquent sans doute l'accès limité aux protéines plasmatiques. En effet, bien que largement utilisée dans les analyses de protéomique de fluide, la déplétion des protéines majoritaires pour réduire la gamme dynamique des protéines plasmatiques (Kit ProteMiner®) a peut-être éliminé également des protéines d'intérêt [Li et al., 2017a]. Dans cette stratégie, basée sur des interactions protéine/ligand, les protéines qui manquent de ligands et/ou ont une affinité

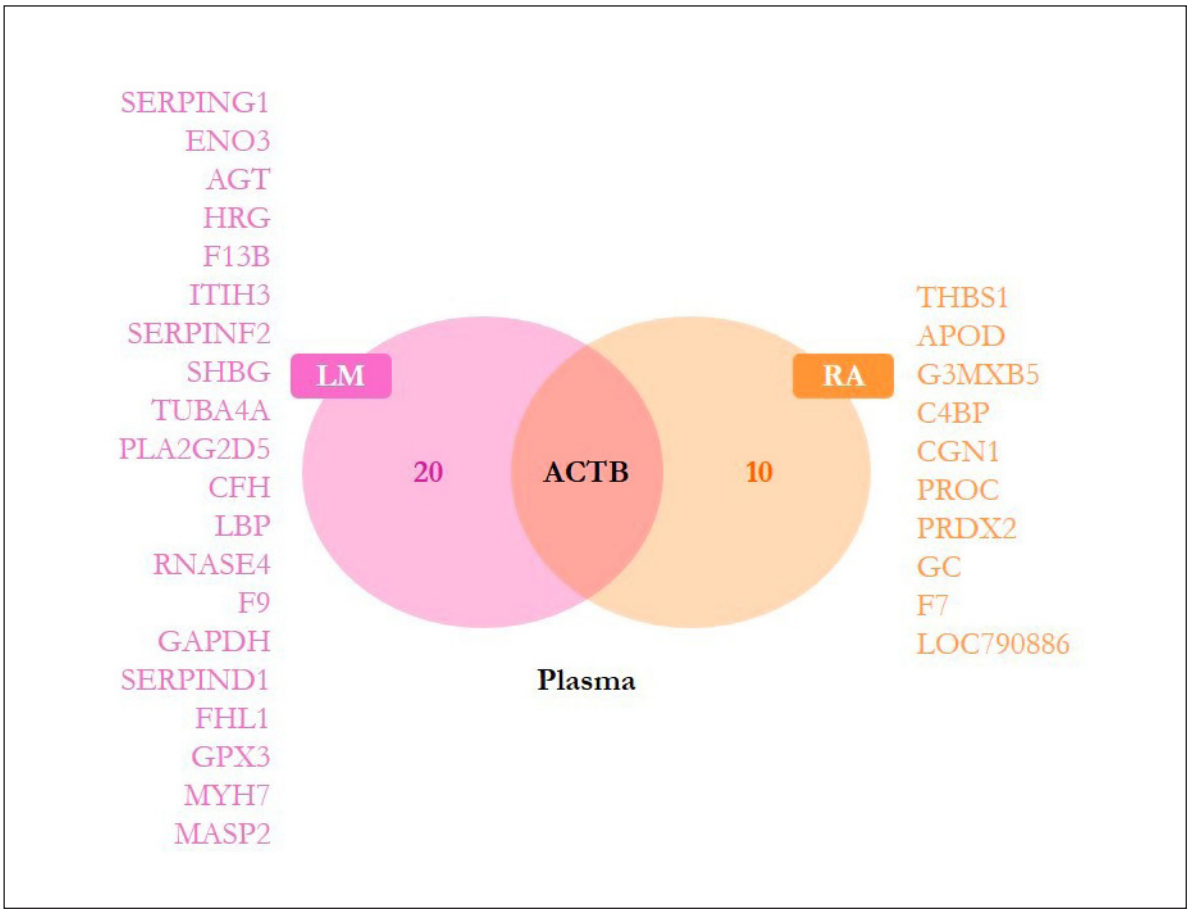


Figure 56. Diagramme de Venn des protéines différentielles identifiées dans les plasmas_LM et _RA
L'ellipse rose contient les 21 protéines identifiées dans le plasma_LM. L'ellipse orange contient les 11 protéines identifiées dans le plasma_RA. L'intersection des deux ellipses contient les protéines communes aux plasmas de ces deux muscles. LM : *Longissimus* ; RA : *Rectus abdominis*.

faible pour ces derniers ne seraient pas efficacement retenues par la colonne, conduisant à leur élimination lors de l'élution [Thulasiraman et al., 2005]. Des liaisons protéine/ligand non-spécifiques associées à une élution incomplète de protéines capturées diminuerait également le nombre de protéines d'intérêt à identifier en MS. Ces limites ont été rapportées dans [Candiano et al., 2012].

Toutefois, la comparaison des protéines identifiées dans les plasmas LM et RA a permis de proposer 10 protéines spécifiques des plasmas_RA, 20 spécifiques des plasmas_LM et 1 commune **(Figure 56)** en lien avec la tendreté. Nous pouvons faire l'hypothèse que ces protéines soient le reflet d'un sécrétome différent pour chaque muscle. Ceci n'est pas surprenant, car le muscle RA a été rapporté comme ayant des caractéristiques structurales et contractiles particulières [Oury et al., 2010]. L'analyse comparative des termes de GO associés aux protéines différentielles des muscle LM et RA confirme cette particularité **(Figure 55, Annexes 1 et 2)**. De plus, comme nous le verrons plus tard, les mécanismes mis en jeu dans la tendreté sont différents dans les deux muscles.

La comparaison des protéines identifiées dans les plasmas LM et RA respectivement **(Figure 56)** permet de mettre en évidence une seule protéine commune, la β-actine (ACTB). La détection de l'ACTB dans le plasma comme biomarqueur de tendreté est un résultat intéressant car il valide l'identification de ce candidat plasmatique dans l'analyse *in silico*. L'ACTB, une protéine abondante et très conservée du cytosquelette joue un rôle crucial dans la migration et la division cellulaire, le développement, la réponse immunitaire et l'expression des gènes [Ruan and Lai, 2007; Bunnell et al., 2011]. Elle augmenterait les dommages oxydatifs dans la viande tendre [Malheiros et al., 2019]. Cependant, l'utilisation de cette protéine comme biomarqueur « générique » reste à explorer. En effet, la relation entre l'abondance plasmatique d'ACTB et la tendreté est différente selon que l'on considère le muscle LM (diminuée dans le groupe tendre) ou RA (augmentée).

2. L'étude du protéome musculaire

L'analyse protéomique des muscles LM et RA avait pour but d'identifier de nouveaux candidats biomarqueurs musculaires, sur la base de leur abondance différentielle entre des groupes d'individus contrastés pour la tendreté de leur viande. L'approche expérimentale s'est appuyée sur la stratégie « Shotgun », technique basée sur de l'électrophorèse uni-dimensionnelle associée à de la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Le nombre total de protéines identifiées avec la méthode « Shotgun » (LM : 268 et RA : 231 protéines validées avec 2 peptides) est relativement peu élevé au vu du protéome musculaire estimé (n=10 000 à 30 000 protéines). Comme nous l'avons vu pour le

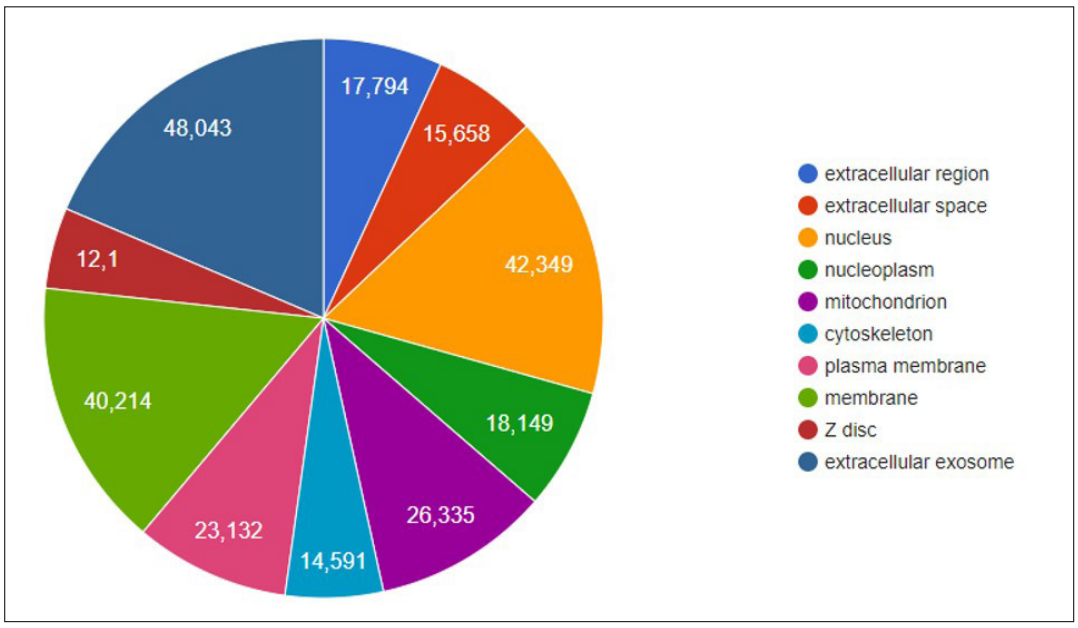


Figure 57. Fréquence des annotations de Gene Ontologie des protéines identifiées dans les échantillons musculaires de LM et RA

L'analyse de Gene Ontologie a été réalisée à partir de l'outil ProteINSIDE. 367 termes ont été identifiés pour cette analyse. Les chiffres correspondent aux pourcentages de protéines musculaires retrouvées dans les termes colorés.

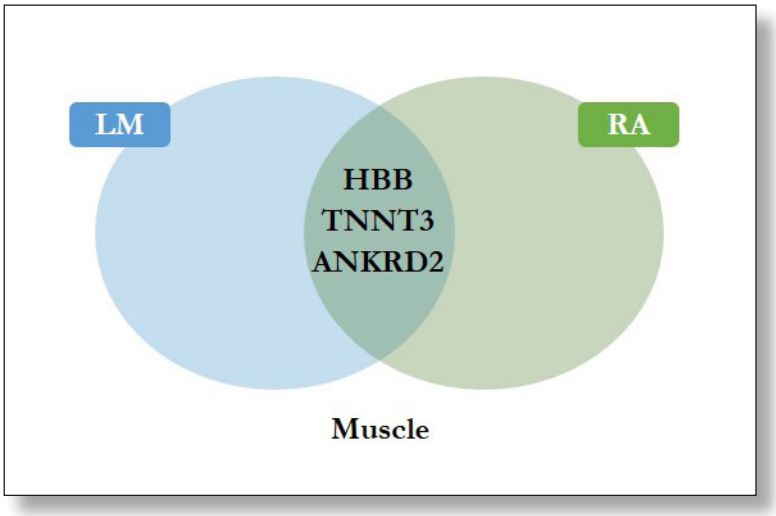


Figure 58. Diagramme de Venn des protéines différentielles identifiées dans les deux muscles LM et RA

L'ellipse bleue contient les 71 protéines identifiées dans le muscle_LM. L'ellipse verte contient les 9 protéines identifiées dans le muscle_RA. L'intersection des deux ellipses contient les protéines communes à ces deux muscles. LM : *Longissimus* ; RA : *Rectus abdominis*.

plasma, les contraintes méthodologiques peuvent expliquer cet accès limité aux protéines musculaires. Toutefois, si la sélection des bandes protéiques des gels 1D a sans aucun doute restreint la gamme de protéines traitées lors de l'analyse protéomique, elle a aussi permis d'obtenir une meilleure résolution pour une meilleure identification des peptides d'intérêt. Les protéomes du muscle LM et RA ont révélé très peu de facteurs de transcription ou de traduction, de facteurs de croissance et de constituants de la matrice extracellulaire **(Figure 57)** Une extraction plus ciblée pourrait permettre d'accéder à ces protéines [Rabilloud et al., 2010; Li et al., 2017a].

Même si ma thèse était orientée sur la découverte de biomarqueurs plasmatiques, mes travaux ont aussi contribué à découvrir de nouveaux biomarqueurs musculaires. En effet, l'approche expérimentale a permis de proposer pour la première fois une liste de 80 candidats musculaires spécifiques des génisses (71 muscle LM, 9 muscle RA). Parmi ces 80 protéines, 47 sont de nouveaux candidats musculaires (38 pour le LM, 9 pour le RA) qui n'ont jamais été proposés dans la littérature **(Figure 59)**. Parmi ces 47 protéines, 14 sont incluses dans des QTL de tendreté (MYOT, MYOZ3, PDLIM7, TMOD1, TNNC1, ALDH1A1, EEF1A2, EEF1G, HPX, OGN, ATP2A2, TPM1, HBB et EPM2A), ce qui renforce leur pertinence comme candidats biomarqueurs. L'identification de ces nouveaux candidats a été permise par le fait que : (i) notre étude est la première menée sur des génisses ; (ii) c'est aussi l'une des premières études utilisant la méthode Shotgun. Toutefois, l'enrichissement en termes GO dans les deux muscles révèle des différences dans les voies biologiques associées aux protéines différentielles. En mettant en évidence l'importance des voies associées aux fibres musculaires (structure, ultrastructure et contraction) dans le RA **(Figure 55)** ces résultats sont en accord avec la littérature [Oury et al., 2010].

La comparaison des protéines identifiées dans le muscle LM et dans le muscle RA respectivement **(Figure 58)** permet de mettre en évidence 3 protéines communes (ANKRD2, HBB et TNNT3). La protéine ANKRD2, impliquée dans la réponse au stress myofibrillaire [Kojic et al., 2011], a été proposée comme une protéine candidate de tendreté par [Picard and Gagaoua, 2020]. Avec le même sens de relation que celui observé ici pour les muscles LM et RA (abondance augmentée dans les viandes tendres), cette protéine apparaît donc comme un bon candidat musculaire « générique ». L'hémoglobine (HBB) a été rapportée comme négativement associé avec la WB de muscle *Longissimus dorsi* de bovin (Angus X Brahman) [Zapata et al., 2009], ce qui est en accord avec notre étude car HBB est augmentée dans les muscles tendres de LM et RA évalués respectivement par analyse sensorielle Tg ou rhéologique WB. De plus, le dosage d'HBB durant la phase de pré-abattage a été proposée pour prédire la couleur de la viande

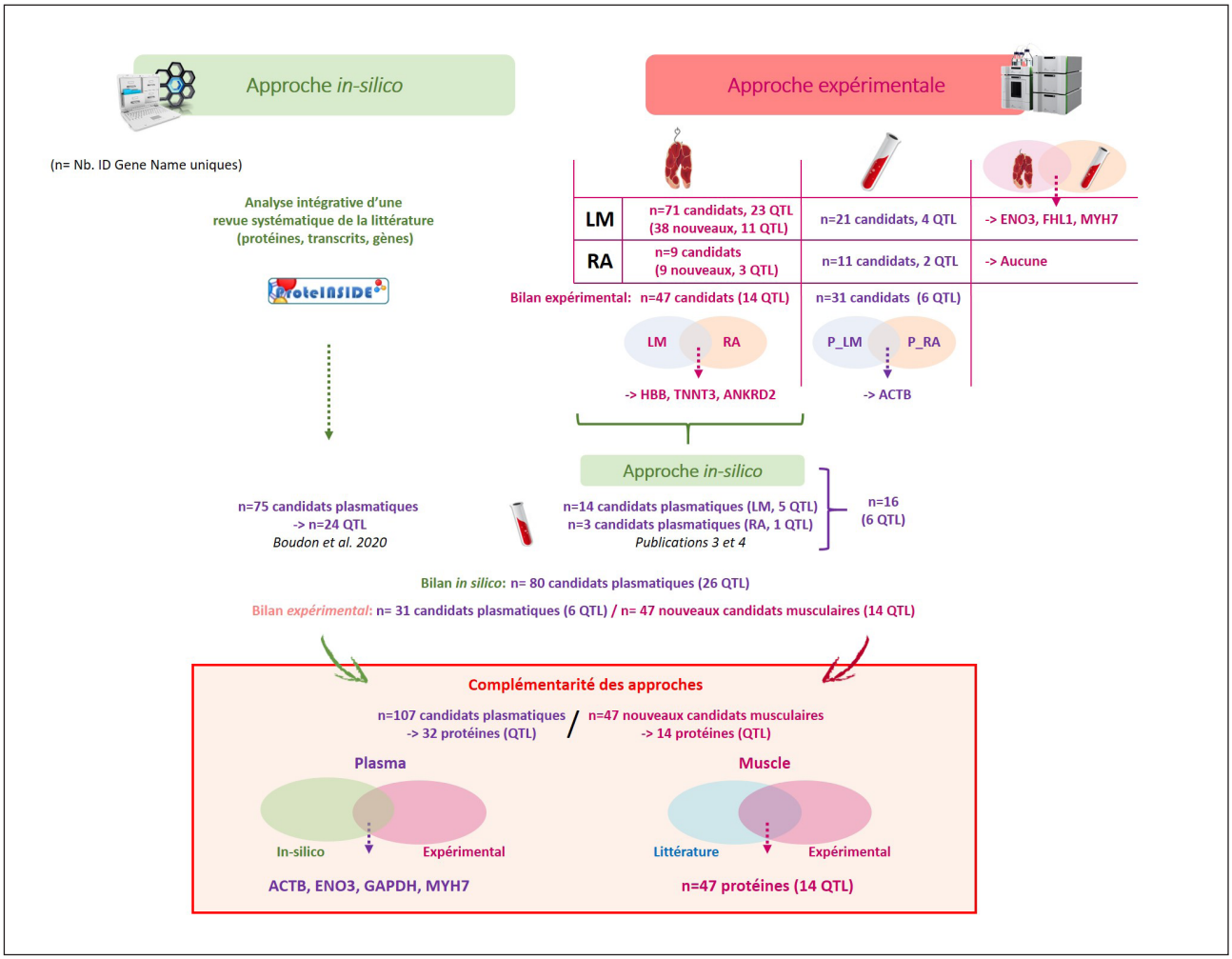


Figure 59. Représentation schématique des résultats obtenus au cours de mes travaux de thèse
L'approche *in silico* (gauche), l'approche expérimentale (droite). Les protéines plasmatiques sont identifiées en violet et les musculaires en fushia. n : Nombre d'ID Gene Name unique. Les diagrammes de Venn permettent de visualiser (i) les protéines communes aux 2 muscles LM et RA, (ii) les protéines communes aux plasmas des deux muscles ou (ii) les protéines communes au muscle et au plasma, respectivement pour le LM et le RA. Le cadre en bas permet de visualiser les protéines identifiées à la fois par l'approche *in silico* et expérimentale (plasmas), ou littérature et expérimental (muscles).

de veau [Wilson et al., 1995; Klont et al., 2000]. Le fait d'identifier cette protéine différentielle entre groupes extrêmes de tendreté pour les deux muscles, associé au fait qu'elle est retrouvée dans un QTL de « Shear force » (Chromosome 15) permet de proposer cette protéine comme un potentiel biomarqueur musculaire « générique ». Nous rapportons dans notre étude une autre protéine commune aux deux muscles LM et RA pour la discrimination des groupes sur l'index Idx : la troponine T (TNNT3). Cette protéine a été révélée comme reliée à la tendreté dans plusieurs études [Picard and Gagaoua, 2020], mais le sens de sa relation avec la tendreté est variable selon le type de muscle [Malheiros et al., 2019]. La protéine TNNT3 a aussi été rapportée comme un biomarqueur de l'hypertrophie musculaire [Bouley et al., 2005]. Ceci est intéressant car ce biomarqueur pourrait permettre de maîtriser à la fois la tendreté mais aussi la masse musculaire, donc le rendement en viande.

III. Les apports de la combinaison des approches : vers la découverte des premiers candidats biomarqueurs plasmatiques

L'ensemble des résultats obtenus au cours de mes travaux de thèse permettent de proposer pour la première fois une liste de 107 candidats plasmatiques **(Figure 59 et Annexe 5)**.

Parmi ces 107 candidats (ID Gene Name uniques) :

- 75 candidats ont été obtenus avec l'analyse *in-silico* de la base de données agrégées à partir de la revue systématique de la littérature. Vingt-quatre d'entre eux sont retrouvés dans des QTL [Boudon et al., 2020].

- 31 ont été découverts par une approche expérimentale. Six d'entre eux sont présents dans des QTL de qualité (Boudon et al. soumis, résultats protéomiques du muscle RA).

- 16 sont issus de la reconstruction du sécrétome musculaire appliquée aux candidats musculaires identifiés par l'approche expérimentale. Parmi eux, 5 protéines (HBB, HPX, HSP90AA1, LDHB, OGN et TPM1) sont associées à des QTL de tendreté. Ces derniers ne sont pas détectés dans le protéome plasmatique des génisses. Ce n'est pas surprenant pour l'HBB car la préparation du plasma ne permet pas forcément d'avoir accès à ces protéines : l'hémoglobine est éliminée au cours de la préparation de ce fluide) ; (ii) LDHB et HSP90AA1 sont hypothétiquement sécrétées et potentiellement sécrétées sous la forme de VEs et/ou d'exosomes qui ne sont pas accessibles dans le plasma sans préparation particulière.

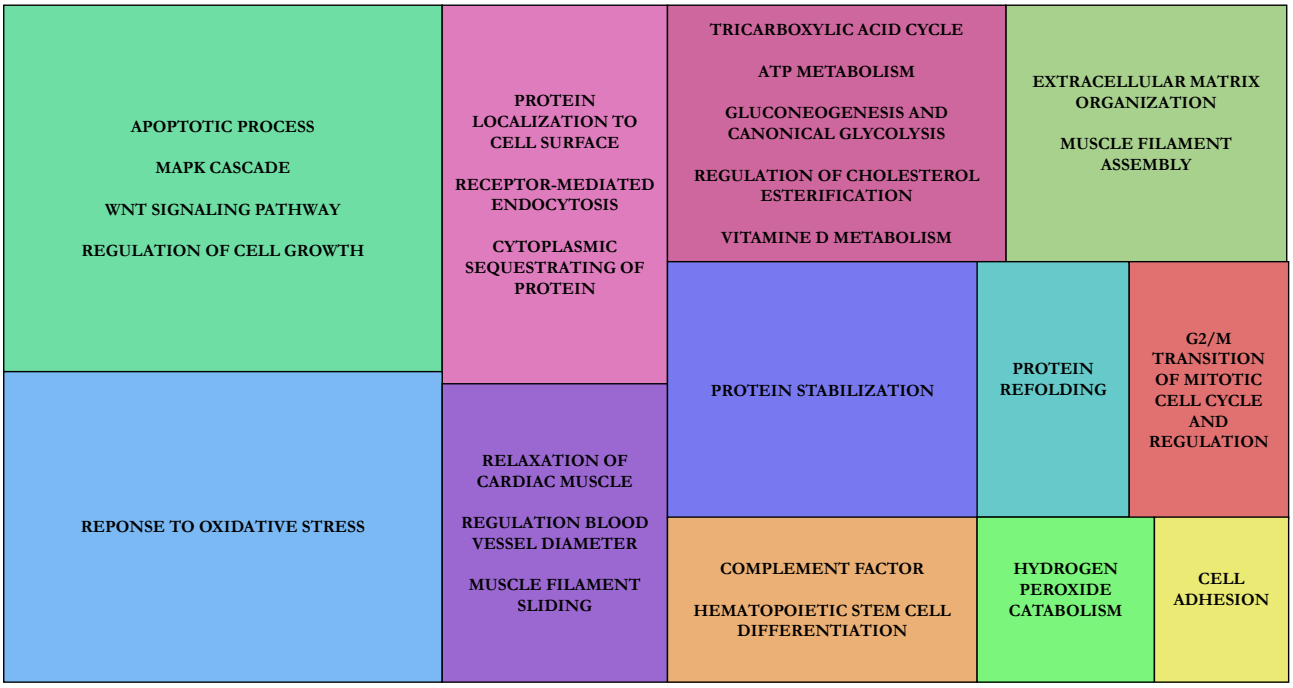


Figure 60. Gene Ontology des 107 protéines candidates plasmatiques idendifiées à partir de l'ensemble de mes travaux de thèse.

Représentation visuelle de la classification sémantique ("TreeMap") de REVIGO. Chaque rectangle représente un cluster unique. Les termes GO représentés sont les termes majeurs. Ils regroupent des termes mineurs en « grande famille ». Chaque « grande famille » de termes GO est visualisée par une couleur. La taille des rectangles a été ajustée pour refléter la valeur de la p-value ajustée issue de l'analyse de Gene Ontology dans ProteINSIDE (P>0.001).

- La comparaison du protéome plasmatique prédit *in silico* et de celui analysé expérimentalement met en évidence 4 candidats (ACTB, ENO3, GAPDH et MYH7) que je propose comme des biomarqueurs d'intérêt à explorer davantage.

- 3 protéines (ENO3, FHL1 et MYH7) sont retrouvées en commun dans les signatures protéomiques différentielles du muscle LM et dans celles du plasma. Aucune n'est détectée pour la comparaison RA/plasma. La relation entre les candidates et la tendreté est toujours inverse entre le muscle et le plasma, ce qui complexifie la compréhension des mécanismes sous-jacents de ces résultats.

- Il est à noter que deux protéines prédites au travers de l'analyse *in silico* du protéome musculaire des génisses (ENO3 et MYH7) sont aussi retrouvées comme différentielles dans l'analyse protéomique de leur plasma, ce qui renforce leur intérêt. Ceci conforte la complémentarité des deux approches que j'ai utilisée.

Les **Figure 60 et 61** illustrent les voies biologiques associées aux 107 candidats plasmatiques. Elle montre que ce répertoire est le reflet des mécanismes biologiques impliqués dans la tendreté connus dans le muscle. Comme évoqué dans la partie bibliographique, le stress des animaux pendant la phase d'élevage ou avant l'abattage peut altérer la qualité de la viande. En comparant la liste de ces candidats plasmatiques avec une liste de transcrits différentiels en réponse au stress dans le muscle *Longissimus* de vaches Normandes (Cassar-Malek, communication personnelle), seules 3 protéines (RGS2, THBS1 et YWHAZ) sont retrouvées en commun. Ainsi, la majorité des candidats plasmatiques de la liste de candidats ne semble donc pas être associés au stress qui altère la qualité de la viande. Cela renforce leur intérêt à être utilisés pendant la phase d'élevage.

Conclusion et Perspectives

Conclusion et Perspectives

L'originalité de mes travaux de thèse réside dans la combinaison de deux approches complémentaires pour la découverte de candidats biomarqueurs de la tendreté. L'approche *in-silico* basée sur une revue systématique de la littérature s'est avérée efficace pour initier leur découverte. En plus d'assurer le démarrage de mes travaux, en réutilisant des données déjà existantes au niveau internationnal, elle s'inscrivait dans la démarche de réduction de l'utilisation des animaux à des fins expérimentales (principe des 3R : remplacement, raffinement et réduction) [Decret Legifrance n°2013-118, 2013]. De plus, mes travaux ont produit un jeu de données qui a été déposé sur Dataverse.INRAE (Datapaper en préparation) ce qui favorisera sa réutilisation ultérieure pour d'autres questions. Un sous-ensemble seulement (tendreté) de la base de données construite au cours de ma thèse a été utilisé. Des données sur les autres critères de qualité (jutosité, flaveur, couleur) ont commencées à être agrégées.

L'ensemble de mes travaux ont confirmé :

1- L'implication des voies biologiques déjà connues (structure et contraction musculaire, métabolisme énergétique du muscle, protéolyse *post-mortem*, apoptose/autophagie et stress oxydant) dans la tendreté de la viande bovine. Ces voies ont été confirmées dans le muscle LM de génisses.

2- L'existence de signatures moléculaires et voies biologiques différentes pour la tendreté dans deux muscles bovins

De plus, ils ont complété la liste de candidats musculaires déjà connus en proposant 47 nouveaux candidats dont 14 sont inclus dans des QTL tendreté. Une analyse *in silico* a permis de repérer parmi ces nouveaux candidats musculaires, ceux susceptibles d'être retrouvés dans le plasma et ceux effectivement retrouvés (ENO3 et MYH7).

L'apport principal de mes travaux est de proposer pour la première fois 107 protéines plasmatiques comme candidats biomarqueurs de la tendreté de la viande bovin **(Annexe 5)**. Certains s'avèrent très pertinents : (i) 32 sont retrouvés dans des QTL de qualité (Shear force et/ou Tenderness score), (ii) 11 ont un polymorphisme génétique (SNP) associé à la tendreté selon les informations de ma base de données, et (iii) 4 sont identifiés avec les deux approches (ACTB, ENO3, GAPDH et MYH7), ce qui ouvre des perspectives de recherche et d'application.

Une première perspective de ma thèse est de poursuivre l'étude de ces candidats plasmatiques les plus pertinents **(Annexe 5)** Selon la démarche proposée par [Rifai et al., 2006], il s'agira d'étudier la relation entre leur abondance protéique dans le plasma et la tendreté de la viande pour un large panel de bovins, notamment sur les plasmas des 66 génisses Fleur d'Aubrac dont nous disposons au laboratoire. L'approche ciblée « Selected Reaction Monitoring » (SRM) est à la validation ce que l'approche protéomique globale « Shotgun » est à la découverte de biomarqueur [Picotti and Aebersold, 2012]. Ainsi, une approche de protéomique ciblée SRM augmenterait la sensibilité de détection de ces candidats protéiques dans le plasma. En effet, la SRM qui rend possible de suivre plusieurs peptides par protéines, et plusieurs protéines différentes dans une même analyse (multiplexage), permettrait d'augmenter nos chances de qualifier leur relation à la tendreté. Cette méthodologie a été développée dans l'équipe pour l'étude de 10 protéines de muscle bovin (Bonnet el al. 2020, en révision). Pour avoir accès aux protéines VEs et exosomales, il serait également intéressant d'isoler des VEs et des exosomes à partir de plasma, pour valider la contribution des voies vésiculaires aux mécanismes de tendreté.

A l'issue de cette analyse, l'obtention d'une liste réduite de candidats pourra être validée et/ou testée sur d'autres cohortes d'animaux [Rifai et al., 2006] sur des plasmas de bovins d'âge, de sexe et de race différentes afin d'identifier les marqueurs les plus « génériques » avant d'envisager de les utiliser pour le phénotypage à grande échelle. La validation de marqueurs plasmatiques de tendreté devra se poursuivre par la mise au point de méthodes de quantifications adaptées à une application en routine (faible coût, rapidité, facilité de mise en œuvre) et le développement d'équations de prédiction. En associant ces résultats avec les travaux sur le dispositif Fleur d'Aubrac (thèse J. Soulat, [Soulat, 2017]), il pourra être envisagé de rechercher les conduites d'élevage les plus adaptées afin de valoriser au mieux le potentiel des animaux. L'identification de biomarqueurs de tendreté peu invasifs pourrait ainsi contribuer à valoriser des filières d'excellence en sélectionnant les animaux au meilleur « potentiel tendreté » afin de maitriser la variabilité de la tendreté. Enfin, combiner la détection et la quantification dans le plasma de ces biomarqueurs et des protéines associées aux 23 gènes candidats liés à la teneur en lipides intra-musculaires [Bazile et al., 2019] pourrait apporter à l'équipe des connaissances sur les mécanismes biologiques communs à ces caractères d'intérêt majeur pour la filière viande bovine. Des marqueurs plasmatiques communs à ces deux caractères pourraient permettre d'évaluer simultanément, du vivant de l'animal, le potentiel de ces deux critères majeurs de la qualité de la viande bovine.

Références bibliographiques

Abril M, Campo M., Önenç A, Sañudo C, Albertí P, Negueruela A. 2001. Beef colour evolution as a function of ultimate pH. Meat Sci. 58: 69–78.

Albert A. 1982. On the use and computation of likelihood ratios in clinical chemistry. Clin. Chem. 28.

Aleo E, Henderson CJ, Fontanini A, Solazzo B, Brancolini C. 2006. Identification of New Compounds That Trigger Apoptosome-Independent Caspase Activation and Apoptosis. Cancer Res. 66: 9235–9244.

Allard S, Adin P, Gouédard L, di Clemente N, Josso N, Orgebin-Crist MC, Picard JY, Xavier F. 2000. Molecular mechanisms of hormone-mediated Müllerian duct regression: involvement of beta-catenin. Development 127: 3349–60.

Allingham PG, Harper GS, Hunter RA. 1998. Effect of growth path on the tenderness of the semitendinosus muscle of Brahman-cross steers. Meat Sci. 48: 65–73.

De Almeida AM, Miller I, Eckersall D. 2017. Proteomics in domestic animals: From farm to systems biology. Springer International Publishing. 1–489 p.

Alonso R, Mazzeo C, Rodriguez MC, Marsh M, Fraile-Ramos A, Calvo V, Avila-Flores A, Merida I, Izquierdo M. 2011. Diacylglycerol kinase α regulates the formation and polarisation of mature multivesicular bodies involved in the secretion of Fas ligand-containing exosomes in T lymphocytes. Cell Death Differ. 18: 1161–1173.

Van Altena SEC, de Klerk B, Hettinga KA, van Neerven RJJ, Boeren S, Savelkoul HFJ, Tijhaar EJ. 2016. A proteomics-based identification of putative biomarkers for disease in bovine milk. Vet. Immunol. Immunopathol. 174: 11–18.

Altintaş EB, Denizli A. 2006. Efficient removal of albumin from human serum by monosize dye-affinity beads. J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 832: 216–223.

Andac CA, Andac M, Denizli A. 2007. Predicting the binding properties of cibacron blue F3GA in affinity separation systems. Int. J. Biol. Macromol. 41: 430–438.

Andaç M. 2015. Cibacron blue immobilized poly(glycidyl-methacrylate) nanobeads for albumin removal in proteome studies. Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol. 43: 133–139.

Andac M, Galaev I, Denizli A. 2012. Dye attached poly(hydroxyethyl methacrylate) cryogel for albumin depletion from human serum. J. Sep. Sci. 35: 1173–1182.

Andersen HJ, Oksbjerg N, Young JF, Therkildsen M. 2005. Feeding and meat quality – a future approach. Meat Sci. 70: 543–554.

Anderson MJ, Lonergan SM, Huff-Lonergan E. 2012. Myosin light chain 1 release from myofibrillar fraction during postmortem aging is a potential indicator of proteolysis and tenderness of beef. Meat Sci. 90: 345–351.

Anderson NL, Anderson NG. 1998. Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words. Electrophoresis 19: 1853–1861.

Anderson NL, Anderson NG. 2002. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. Mol. Cell. Proteomics 1: 845–867.

Anses. 2007. INCA 2. Etude individuelle Nationale sur les Consommations Alimentaires.

Anses. 2017. INCA 3. Evolution des habitudes et modes de consommation.

Aranda B, Blankenburg H, Kerrien S, Brinkman FSL, Ceol A, Chautard E, Dana JM, De Las Rivas J, Dumousseau M, Galeota E, Gaulton A, Goll J, Hancock REW, Isserlin R, Jimenez RC, Kerssemakers J, Khadake J, Lynn DJ, Michaut M, O'Kelly G, Ono K, Orchard S, Prieto C, Razick S, Rigina O, Salwinski L, Simonovic M, Velankar S, Winter A, Wu G, Bader GD, Cesareni G, Donaldson IM, Eisenberg D, Kleywegt GJ, Overington J, Ricard-Blum S, Tyers M, Albrecht M, Hermjakob H. 2011. PSICQUIC and PSISCORE: accessing and scoring molecular interactions. Nat. Methods 8: 528–529.

Arrigo A-P, Paul C, Ducasse C, Manero F, Kretz-Remy C, Virot S, Javouhey E, Mounier N, Diaz-Latoud C. 2002. Small stress proteins: novel negative modulators of apoptosis induced independently of reactive oxygen species. Prog. Mol. Subcell. Biol. 28: 185–204.

Ashkenazi A. 2002. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. Nat. Rev. Cancer 2: 420–430.

Astruc T. 2014. Connective tissue: structure, function, and influence on meat quality. Encycl. Meat Sci. (1), 2014, 321-328.

Atak A, Khurana S, Gollapalli K, Reddy PJ, Levy R, Ben-Salmon S, Hollander D, Donyo M, Heit A, Hotz-Wagenblatt A, Biran H, Sharan R, Rane S, Shelar A, Ast G, Srivastava S. 2018. Quantitative mass spectrometry analysis reveals a panel of nine proteins as diagnostic markers for colon adenocarcinomas. Oncotarget 9: 13530–13544.

Bailey AJ, Light ND (Nicholas D. 1989. Connective tissue in meat and meat products. Elsevier Applied Science. 355 p.

Baixauli F, López-Otín C, Mittelbrunn M. 2014. Exosomes and autophagy: Coordinated mechanisms for the maintenance of cellular fitness. Front. Immunol. 5.

Balan P, Kim YHB, Blijenburg R. 2014. Small heat shock protein degradation could be an indicator of the extent of myofibrillar protein degradation. Meat Sci. 97: 220–222.

Baldassini WA, Braga CP, Chardulo LAL, Silva JAIV, Malheiros JM, de Albuquerque LG, Fernandes TT, Padilha P de 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 Chem. 169: 65–72.

Bansal N, Gupta AK, Gupta A, Sankhwar SN, Mahdi AA. 2016. Serum-based protein biomarkers of bladder cancer: A pre- and post-operative evaluation. J. Pharm. Biomed. Anal. 124: 22–25.

Barendse WJ. 2002. DNA MARKERS FOR MEAT TENDERNESS.

Barlowe C, Orci L, Yeung T, Hosobuchi M, Hamamoto S, Salama N, Rexach MF, Ravazzola M, Amherdt M, Schekman R. 1994. COPII: A membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. Cell 77: 895–907.

Von Bartheld CS, Altick AL. 2011. Multivesicular bodies in neurons: Distribution, protein content, and trafficking functions. Prog. Neurobiol. 93: 313–340.

Bas et Sauvant. 2001. Variations de la composition des dépôts lipidiques chez les bovins. Inra Prod. Anim. 14(5): 311–322.

Bauchart et Gandemer. 2010. Qualite nutritionnelle des viandes et abats de bovins. In: In: D. Bauchart and B. Picard (eds.) Muscle et viande de ruminant., p 115–130.

Bazile J. 2019. Intégration de données publiques et analyses protéomiques pour relever les mécanismes et biomarqueurs du dépôt lipide dans la carcasse ou le muscle bovin.

Bazile J, Picard B, Chambon C, Valais A, Bonnet M. 2019. Pathways and biomarkers of marbling and carcass fat deposition in bovine revealed by a combination of gel-based and gel-free proteomic analyses. Meat Sci. 156: 146–155.

Beauclercq S, Nadal-Desbarats L, Hennequet-Antier C, Collin A, Tesseraud S, Bourin M, Le Bihan-Duval E, Berri C. 2016. Serum and Muscle Metabolomics for the Prediction of Ultimate pH, a Key Factor for Chicken-Meat Quality. J. Proteome Res. 15: 1168–1178.

Beer LA, Ky B, Barnhart KT, Speicher DW. 2017. In-depth, reproducible analysis of human plasma using IgY 14 and SuperMix immunodepletion. In: Methods in Molecular Biology. Humana Press Inc., p 81–101.

Beere HM. 2004. "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. J. Cell Sci. 117: 2641–51.

Beere HM. 2005. Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. J. Clin. Invest. 115: 2633–2639.

Bellone M, Iezzi G, Rovere P, Galati G, Ronchetti A, Protti MP, Davoust J, Rugarli C, Manfredi AA. 1997. Processing of engulfed apoptotic bodies yields T cell epitopes. J. Immunol. 159: 5391–9.

Bendall JR. 1979. Relations between muscle pH and important biochemical parameters during the postmortem changes in mammalian muscles. Meat Sci. 3: 143–157.

Bendixen E. 2005. The use of proteomics in meat science. Meat Sci. 71: 138–149.

Bendixen E. 2013. Understanding the Proteome. In: Proteomics in Foods. Boston, MA: Springer US, p 3–19.

Berchtold MW, Brinkmeier H, Müntener M. 2000. Calcium Ion in Skeletal Muscle: Its Crucial Role for Muscle Function, Plasticity, and Disease. Physiol. Rev. 80: 1215–1265.

Berda-Haddad Y, Robert S, Salers P, Zekraoui L, Farnarier C, Dinarello CA, Dignat-George F, Kaplanski G. 2011. Sterile inflammation of endothelial cell-derived apoptotic bodies is mediated by interleukin-1α. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108: 20684–20689.

Berg TO, Fengsrud M, Strømhaug PE, Berg T, Seglen PO. 1998. Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. J. Biol. Chem. 273: 21883–92.

Van den Bergh JCJM, Button KJ, van den Bergh J, Button K. 1997. Meta-analysis of Environmental

Issues in Regional, Urban and Transport Economics. Urban Stud. 34: 927–944.

Bergmann-Leitner ES, Mease RM, Duncan EH, Khan F, Waitumbi J, Angov E. 2008. Evaluation of immunoglobulin purification methods and their impact on quality and yield of antigen-specific antibodies. Malar. J. 7.

Bernard C, Cassar-Malek I, Le Cunff M, Dubroeucq H, Renand G, Hocquette JF. 2007. New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. J. Agric. Food Chem. 55: 5229–5237.

Bidault C. 1927. Conservation de la viande et du poisson, Baillière. Paris.

Biga LM, Dawson S, Harwell A, Hopkins R, Kaufmann J, LeMaster M, Matern P, Morrison-Graham K, Quick D, Runyeon J. 2020. Anatomy & Physiology. In: Anatomy & Physiology, by Rice Un. OpenStax/Oregon State University.

Le Bihan MC, Bigot A, Jensen SS, Dennis JL, Rogowska-Wrzesinska A, Lainé J, Gache V, Furling D, Jensen ON, Voit T, Mouly V, Coulton GR, Butler-Browne G. 2012. In-depth analysis of the secretome identifies three major independent secretory pathways in differentiating human myoblasts. J. Proteomics 77: 344–356.

Biomarkers Definitions Working Group. 2001. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. Clin. Pharmacol. Ther. 69: 89–95.

Bizat N, Hermel J-M, Humbert S, Jacquard C, Créminon 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. J. Biol. Chem. 278: 43245–43253.

Bjarnadóttir SG, Hollung K, Frgestad EM, 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: 7408–7414.

Bjarnadóttir SG, Hollung K, Høy M, Bendixen E, Codrea MC, Veiseth-Kent E, Bjarnadottir SG, Hollung K, Hoy M, Bendixen E, Codrea MC, 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: 2035–2043.

Black LV, Saunderson SC, Coutinho FP, Muhsin-Sharafaldine MR, Damani TT, Dunn AC, McLellan AD. 2016. The CD169 sialoadhesin molecule mediates cytotoxic T-cell responses to tumour apoptotic vesicles. Immunol. Cell Biol. 94: 430–438.

Blanc L, Vidal M. 2018. New insights into the function of Rab GTPases in the context of exosomal secretion. Small GTPases 9: 95–106.

Bollineni RC, Guldvik IJ, Grönberg H, Wiklund F, Mills IG, Thiede B. 2015. A differential protein solubility approach for the depletion of highly abundant proteins in plasma using ammonium sulfate. Analyst 140: 8109–8117.

Bonifacino JS, Glick BS. 2004. The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion. Cell 116: 153–166.

Bonifati V, Rizzu P, Squitieri F, Krieger E, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, van Duijn CM, Oostra

B, Meco G, Heutink P. 2003. DJ-1(PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. Neurol. Sci. 24: 159–160.

Bonnet M, Cassar-Malek I, Chilliard Y, Picard B. 2010. Ontogenesis of muscle and adipose tissues and their interactions in ruminants and other species. animal 4: 1093–1109.

Bonnet M, Tournayre J, Cassar-Malek I. 2016. Integrated data mining of transcriptomic and proteomic datasets to predict the secretome of adipose tissue and muscle in ruminants. Mol. Biosyst. 12: 2722–2734.

Bortoluzzi S, Scannapieco P, Cestaro A, Danieli GA, Schiaffino S. 2005. Computational reconstruction of the human skeletal muscle secretome. Proteins Struct. Funct. Bioinforma. 62: 776–792.

Boschetti E, Righetti PG. 2013. Optimized sample treatment protocol by solid-phase peptide libraries to enrich for protein traces. Amino Acids 45: 1431–1442.

Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, Moher D, Rennie D, de Vet HCW, Lijmer JG, Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy. 2003. The STARD Statement for Reporting Studies of Diagnostic Accuracy: Explanation and Elaboration. Ann. Intern. Med. 138: W1.

Bottinelli R, Reggiani C. 2000. Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity. Prog. Biophys. Mol. Biol. 73: 195–262.

Boudjellal A, Becila S, Coulis G, Herrera-Mendez CH, Aubry L, Lepetit J, Harhoura K, Sent MA, Reu, Aiuml H, t-Amar, Ouali AA. 2008. Is the pH drop profile curvilinear and either monophasic or polyphasic? Consequences on the ultimate bovine meat texture.

Boudon S, Cassar-Malek I. 2019. Dataset of proteins related to beef tenderness, V1e. deposed on the Portail Data Inrae.

Boudon S, Henry-Berger J, Cassar-Malek I. 2020. Aggregation of Omic Data and Secretome Prediction Enable the Discovery of Candidate Plasma Biomarkers for Beef Tenderness. Int. J. Mol. Sci. 21: 664.

Bouley J, Chambon C, Picard B. 2004a. Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. Proteomics 4: 1811–1824.

Bouley J, Chambon C, Picard B. 2004b. Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. Proteomics 4: 1811–1824.

Bouley J, Meunier B, Chambon C, De Smet S, Hocquette JF, Picard B. 2005. Proteomic analysis of bovine skeletal muscle hypertrophy. Proteomics 5: 490–500.

Bouley J, Meunier B, Culioli J, Picard B. 2004c. Analyse protéomique du muscle de Bovin appliquée à la recherche de marqueurs de la tendreté de la viande. Renc. Rech. Rumin.: 87–89.

Bourre. 2011. Apports nutritifs des viandes bovines. In: Académie Nationale de Médecine, editor.

Brand MD. 2010. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. Exp. Gerontol. 45: 466–472.

Brandebourg T. 2013. Growth of Muscle from the Myoblast to Whole Muscle. In: The Science of Meat

Quality. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Inc., p 1–27.

Bright NA, Gratian MJ, Luzio JP. 2005. Endocytic delivery to lysosomes mediated by concurrent fusion and kissing events in living cells. Curr. Biol. 15: 360–365.

Brown JK, Lauer KB, Ironmonger EL, Inglis NF, Bourne TH, Critchley HOD, Horne AW. 2013. Shotgun Proteomics Identifies Serum Fibronectin as a Candidate Diagnostic Biomarker for Inclusion in Future Multiplex Tests for Ectopic Pregnancy. PLoS One 8: e66974.

Brügger B, Bankaitis VA. 2012. Lipids and vesicular transport. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids 1821: 1039.

Brulé C, Dargelos E, Diallo R, Listrat A, Béchet D, Cottin P, Poussard S. 2010. Proteomic study of calpain interacting proteins during skeletal muscle aging. Biochimie 92: 1923–1933.

Bruns C, McCaffery JM, Curwin AJ, Duran JM, Malhotra V. 2011. Biogenesis of a novel compartment for autophagosome-mediated unconventional protein secretion. J. Cell Biol. 195: 979–992.

Bunnell TM, Burbach BJ, Shimizu Y, Ervasti JM. 2011. β-Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool. Mol. Biol. Cell 22: 4047–4058.

Burt DW. 2009. The cattle genome reveals its secrets. J. Biol. 8.

Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. 2012. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Elsevier Health Sciences. 2259 p.

Buschow SI, Liefhebber JMP, Wubbolts R, Stoorvogel W. 2005. Exosomes contain ubiquitinated proteins. Blood Cells, Mol. Dis. 35: 398–403.

Caccia D, Dugo M, Callari M, Bongarzone I. 2013. Bioinformatics tools for secretome analysis. Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics 1834: 2442–2453.

Campo MM, Nute GR, Hughes SI, Enser M, Wood JD, Richardson RI. 2006. Flavour perception of oxidation in beef. Meat Sci. 72: 303–311.

Candiano G, Santucci L, Bruschi M, Petretto A, Ambrosio CD, Scaloni A, Righetti PG, Ghiggeri GM. 2012. "Cheek-to-cheek" urinary proteome profiling via combinatorial peptide ligand libraries: A novel, unexpected elution system. J. Proteomics 75: 796–805.

Canet-Avilés RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R, McLendon C, Bandyopadhyay S, Baptista MJ, Ringe D, Petsko GA, Cookson MR. 2004. The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. Proc. Natl. Acad. Sci. 101: 9103–9108.

Cantor DI, Nice EC, Baker MS. 2015. Recent findings from the human proteome project: Opening the mass spectrometry toolbox to advance cancer diagnosis, surveillance and treatment. Expert Rev. Proteomics 12: 279–293.

Cappiello A, Famiglini G, Palma P, Siviero A. 2005. Liquid chromatography-electron ionization mass spectrometry: Fields of application and evaluation of the performance of a Direct-EI interface. Mass Spectrom. Rev. 24: 978–989.

Carafoli E. 2002. Calcium signaling: A tale for all seasons. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99: 1115–1122.

Carayon K, Chaoui K, Ronzier E, Lazar I, Bertrand-Michel J, Roques V, Balor S, Terce F, Lopez A, Salomé L, Joly E. 2011. Proteolipidic composition of exosomes changes during reticulocyte maturation. J. Biol. Chem. 286: 34426–34439.

Carvalho ME, Gasparin G, Poleti MD, Rosa AF, Balieiro JCC, Labate CA, Nassu RT, Tullio RR, Regitano LC de A, Mourão GB, Coutinho LL. 2014. Heat shock and structural proteins associated with meat tenderness in Nellore beef cattle, a Bos indicus breed. Meat Sci. 96.

Cassar-Malek I, Hocquette JF, 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. Anim. Sci. 79: 49–59.

Cassar-Malek I, Picard B. 2016. Expression Marker-Based Strategy to Improve Beef Quality. Sci. World J. 2016: 1–11.

Cenni V, Kojic S, Capanni C, Faulkner G, Lattanzi G. 2019. Ankrd2 in Mechanotransduction and Oxidative Stress Response in Skeletal Muscle: New Cues for the Pathogenesis of Muscular Laminopathies. Oxid. Med. Cell. Longev. 2019: 7318796.

Chairoungdua A, Smith DL, Pochard P, Hull M, Caplan MJ. 2010. Exosome release of β-catenin: A novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. J. Cell Biol. 190: 1079–1091.

Chasserot-Golaz S, Vitale N, Umbrecht-Jenck E, Knight D, Gerke V, Bader M-F. 2005. Annexin 2 promotes the formation of lipid microdomains required for calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles. Mol. Biol. Cell 16: 1108–19.

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. Boston, MA: Springer US, p 127–146.

Chen YY, Lin SY, Yeh YY, Hsiao HH, Wu CY, Chen ST, Wang AHJ. 2005. A modified protein precipitation procedure for efficient removal of albumin from serum. Electrophoresis 26: 2117–2127.

Cheng Y, Schorey JS. 2016. Targeting soluble proteins to exosomes using a ubiquitin tag. Biotechnol. Bioeng. 113: 1315–1324.

Chikuni K, Muroya S, Nakajima I. 2004. Myosin heavy chain isoforms expressed in bovine skeletal muscles. Meat Sci. 67: 87–94.

Chowdhury I, Tharakan B, Bhat G. 2006. Current concepts in apoptosis: The physiological suicide program revisited. Cell. Mol. Biol. Lett. 11: 506–525.

Christensen PU, Davey J, Nielsen O. 1997. The Schizosaccharomyces pombe mam1 gene encodes an ABC transporter mediating secretion of M-factor. Mol. Gen. Genet. MGG 255: 226–236.

Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL. 2000. Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. BioEssays 22: 442–451.

Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC. 2002. Striated Muscle Cytoarchitecture: An Intricate Web of Form and Function. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 18: 637–706.

Cocca BA, Cline AM, Radic MZ. 2002. Blebs and Apoptotic Bodies Are B Cell Autoantigens. J. Immunol. 169: 159–166.

Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. 2009. Shedding microvesicles: artefacts no more. Trends Cell Biol. 19: 43–51.

Colantonio DA, Dunkinson C, Bovenkamp DE, Van Eyk JE. 2005. Effective removal of albumin from serum. Proteomics 5: 3831–3835.

Colombo M, Moita C, van Niel G, Kowal J, Vigneron J, Benaroch P, Manel N, Moita LF, Théry C, Raposo G. 2013. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. J. Cell Sci. 126: 5553–5565.

Colombo M, Raposo G, Théry C. 2014. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 30: 255–289.

Corpet DE. 2011. Red meat and colon cancer: Should we become vegetarians, or can we make meat safer? Meat Sci. 89: 310–316.

Crouse JD, Schanbacher BD, Cross HR, Seideman SC, Smith SB. 1987. Growth and carcass traits of heifers as affected by hormonal treatment. J. Anim. Sci. 64: 1434–1440.

Culioli J. 1999. La qualité de la viande bovine : aspects biologiques et technologiques de la gestion de la tendreté. Bull Acad Vét Fr. 72: 25–46.

Cunsolo V, Muccilli V, Saletti R, Foti S. 2014. Mass spectrometry in food proteomics: a tutorial. J. Mass Spectrom. 49: 768–784.

Curwin AJ, Brouwers N, Alonso Y Adell M, Teis D, Turacchio G, Parashuraman S, Ronchi P, Malhotra V. 2016. ESCRT-III drives the final stages of CUPS maturation for unconventional protein secretion. Elife 5.

Cuvelier C, Cabaraux JF, Dufrasne I, Clinquart A, Hocquette JF, Istasse L, Hornick J-L. 2006. 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. Anim. Sci. 82: 125–132.

D'Agostino RB, Weintraub M. 1995. Meta-analysis: A method for synthesizing research*. Clin. Pharmacol. Ther. 58: 605–616.

D'Alessandro A, Marrocco C, Rinalducci S, Mirasole C, Failla S, Zolla L. 2012a. Chianina beef tenderness investigated through integrated Omics. J. Proteomics 75: 4381–4398.

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: 4360–4380.

D'Alessandro A, Zolla L. 2013a. Foodomics to investigate meat tenderness. TrAC Trends Anal. Chem. 52: 47–53.

D'Alessandro A, Zolla L. 2013b. Meat science: From proteomics to integrated omics towards system biology. J. Proteomics 78: 558–577.

Danial NN, Korsmeyer SJ. 2004. Cell Death: Critical Control Points. Cell 116: 205–219.

Dean M, Annilo T. 2005. EVOLUTION OF THE ATP-BINDING CASSETTE (ABC) TRANSPORTER SUPERFAMILY IN VERTEBRATES. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 6: 123–142.

Dean PDG, Watson DH. 1979. Protein purification using immobilised triazine dyes. J. Chromatogr. A 165: 301–319.

Decret Legifrance n°2013-118. 2013. Décret relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. 2199.

Delerins R, Raffard P. 2017. Comprendre la consommation de viande : aujourd'hui et demain. In: LAB I– F., editor., p Comprendre la consommation de viande : aujourd'hui.

Delosière M, Pires J, Bernard L, Cassar-Malek I, Bonnet M. 2019. Milk proteome from in silico data aggregation allows the identification of putative biomarkers of negative energy balance in dairy cows. Sci. Rep. 9: 9718.

Dementiev A, Simonovic M, Volz K, Gettins PGW. 2003. Canonical inhibitor-like interactions explain reactivity of alpha1-proteinase inhibitor Pittsburgh and antithrombin with proteinases. J. Biol. Chem. 278: 37881–7.

Democratizing proteomics data. 2007. Nat. Biotechnol. 25: 262.

Denizli A, Pişkin E. 2001. Dye-ligand affinity systems. J. Biochem. Biophys. Methods 49: 391–416.

Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B, Martinou JC. 1999. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. J. Cell Biol. 144: 891–901.

Desdín-Micó G, Mittelbrunn M. 2017. Role of exosomes in the protection of cellular homeostasis. Cell Adhes. Migr. 11: 127–134.

Diamond J. 2002. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. Nature 418: 700–707.

Dlamini Z, Mbita Z, Zungu M. 2004. Genealogy, expression, and molecular mechanisms in apoptosis. Pharmacol. Ther. 101: 1–15.

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. Anim. Sci. 76: 387–399.

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: 555–561.

Dujon B, Pelletier G. 2019. Trajectoires de la génétique, IST Edition Ltd.

Dupont N, Jiang S, Pilli M, Ornatowski W, Bhattacharya D, Deretic V. 2011. Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1β. EMBO J. 30: 4701–4711.

Duran JM, Anjard C, Stefan C, Loomis WF, Malhotra V. 2010. Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes. J. Cell Biol. 188: 527–36.

Durcin M, Fleury A, Taillebois E, Hilairet G, Krupova Z, Henry C, Truchet S, Trötzmüller M, Köfeler H, Mabilleau G, Hue O, Andriantsitohaina R, Martin P, Lay S Le. 2017. Characterisation of adipocyte-derived extracellular vesicle subtypes identifies distinct protein and lipid signatures for large and small extracellular vesicles. J. Extracell. Vesicles 6.

Dutaud D, Aubry L, Sentandreu MA, Ouali A. 2006. Bovine muscle 20S proteasome: I. Simple purification procedure and enzymatic characterization in relation with postmortem conditions. Meat Sci. 74: 327–336.

Ebert AD, Laußmann M, Wegehingel S, Kaderali L, Erfle H, Reichert J, Lechner J, Beer H-D, Pepperkok R, Nickel W. 2010. Tec-Kinase-Mediated Phosphorylation of Fibroblast Growth Factor 2 is Essential for Unconventional Secretion. Traffic 11: 813–826.

Elmore S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Toxicol. Pathol. 35: 495–516.

Elsik CG, Tellam RL, Worley KC, Gibbs RA, Muzny DM, Weinstock GM, Adelson DL, Eichler EE, Elnitski L, Guigo R, Hamernik DL, Kappes SM, Lewin HA, Lynn DJ, Nicholas FW, Reymond A, Rijnkels M, Skow LC, Zdobnov EM, Schook L, Womack J, Alioto T, Antonarakis SE, Astashyn A, Chapple CE, Chen H-C, Chrast J, Camara F, Ermolaeva O, Henrichsen CN, Hlavina W, Kapustin Y, Kiryutin B, Kitts P, Kokocinski F, Landrum M, Maglott D, Pruitt K, Sapojnikov V, Searle SM, Solovyev V, Souvorov A, Ucla C, Wyss C, Anzola JM, Gerlach D, Elhaik E, Graur D, Reese JT, Edgar RC, McEwan JC, Payne GM, Raison JM, Junier T, Kriventseva E V., Eyras E, Plass M, Donthu R, Larkin DM, Reecy J, Yang MQ, Chen L, Cheng Z, Chitko-McKown CG, Liu GE, Matukumalli LK, Song J, Zhu B, Bradley DG, Brinkman FSL, Lau LPL, Whiteside MD, Walker A, Wheeler TT, Casey T, German JB, Lemay DG, Maqbool NJ, Molenaar AJ, Seo S, Stothard P, Baldwin CL, Baxter R, Brinkmeyer-Langford CL, Brown WC, Childers CP, Connelley T, Ellis SA, Fritz K, Glass EJ, Herzig CTA, Iivanainen A, Lahmers KK, Bennett AK, Dickens CM, Gilbert JGR, Hagen DE, Salih H, et al. 2009. The Genome Sequence of Taurine Cattle: A Window to Ruminant Biology and Evolution. Science (80-.). 324: 522–528.

Ertbjerg P, Puolanne E. 2017. Muscle structure, sarcomere length and influences on meat quality: A review. Meat Sci. 132: 139–152.

Escola JM, Kleijmeer MJ, Stoorvogel W, Griffith JM, Yoshie O, Geuze HJ. 1998. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. J. Biol. Chem. 273: 20121–20127.

Evrat-Georgel C. 2008. Bibliographie critique des méthodes instrumentales de mesure de la tendreté de la viande bovine. In: Département technique d'Elevage et Santé SQ des VP, editor.

Fader CM, Sánchez DG, Mestre MB, Colombo MI. 2009. TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res. 1793: 1901–1916.

Fader CM, Savina A, Sánchez D, Colombo MI. 2005. Exosome secretion and red cell maturation: Exploring molecular components involved in the docking and fusion of multivesicular bodies in K562 cells. Blood Cells, Mol. Dis. 35: 153–157.

Feinstein TN, Linstedt AD. 2008. GRASP55 Regulates Golgi Ribbon Formation. Mol. Biol. Cell 19: 2696–2707.

Fernández C, Santos HM, Ruíz-Romero C, Blanco FJ, Capelo-Martínez JL. 2011. A comparison of depletion versus equalization for reducing high-abundance proteins in human serum. Electrophoresis 32: 2966–2974.

Ferro-Novick S, Brose N. 2013. Nobel 2013 Physiology or medicine: Traffic control system within cells. Nature 504: 98.

Fesik SW, Shi Y. 2001. STRUCTURAL BIOLOGY: Controlling the Caspases. Science (80-.). 294: 1477–1478.

Fidziańska A, Kamińska A, Glinka Z. 1991. Muscle cell death. Ultrastructural differences between muscle cell necrosis and apoptosis. Neuropatol. Pol. 29: 19–28.

Fischer C, Hamm R. 1980. Biochemical studies on fast glycolysing bovine muscle. Meat Sci. 4: 41–49.

Fisher AB. 2011. Peroxiredoxin 6: A Bifunctional Enzyme with Glutathione Peroxidase and Phospholipase A_2 Activities. Antioxid. Redox Signal. 15: 831–844.

Fonseca LFS, Gimenez DFJ, dos Santos Silva DB, Barthelson R, Baldi F, Ferro JA, Albuquerque LG. 2017. Differences in global gene expression in muscle tissue of Nellore cattle with divergent meat tenderness. BMC Genomics 18: 945.

Fontanesi L, Davoli R, Nanni Costa L, Scotti E, Russo V. 2003. Study of candidate genes for glycolytic potential of porcine skeletal muscle: identification and analysis of mutations, linkage and physical mapping and association with meat quality traits in pigs. Cytogenet. Genome Res. 102: 145–151.

Forterre A, Jalabert A, Berger E, Baudet M, Chikh K, Errazuriz E, De Larichaudy J, Chanon S, Weiss-Gayet M, Hesse A-M, Record M, Geloen A, Lefai E, Vidal H, Couté Y, Rome S. 2014. Proteomic Analysis of C2C12 Myoblast and Myotube Exosome-Like Vesicles: A New Paradigm for Myoblast-Myotube Cross Talk? PLoS One 9: e84153.

Franco SJ, Huttenlocher A. 2005. Regulating cell migration: calpains make the cut. J. Cell Sci. 118: 3829–38.

Fuentes-Priors P, Salvesen GS. 2004. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. Biochem. J. 384: 201–232.

Futter CE, White IJ. 2007. Annexins and endocytosis. Traffic 8: 951–958.

Gagaoua M, Boudida Y, Becila S, Picard B, Boudjellal A, Sentandreu M, Ouali A, Gagaoua M, Boudida Y, Becila S, Picard B, Boudjellal A, Sentandreu M, Ouali A. 2012. New Caspases' inhibitors belonging to the serpin superfamily: A novel key control point of apoptosis in mammalian tissues. Adv. Biosci. Biotechnol. 03: 740–750.

Gagaoua M, Boudjellal A, Becila S, Boudida Y, Herrera-Mendez C, Sentandreu M, Ouali A. 2013. Apoptosis regulation in postmortem muscle: cross-class inhibition of caspases by two bovine serpins | Request PDF. Proceedings of the 59th International Congress of Meat Science and Technology, At Izmir, Turkey.

Gagaoua M, Claudia Terlouw EM, Boudjellal A, Picard B. 2015a. Coherent correlation networks among protein biomarkers of beef tenderness: What they reveal. J. Proteomics 128: 365–374.

Gagaoua M, Couvreur S, Le Bec G, Aminot G, Picard B. 2017. Associations among Protein Biomarkers and pH and Color Traits in *Longissimus thoracis* and *Rectus abdominis* Muscles in Protected Designation of Origin Maine-Anjou Cull Cows. J. Agric. Food Chem. 65: 3569–3580.

Gagaoua M, Hafid K, Boudida Y, Becila S, Ouali A, Picard B, Boudjellal A, Sentandreu MA. 2015b. Caspases and Thrombin Activity Regulation by Specific Serpin Inhibitors in Bovine Skeletal Muscle. Appl. Biochem. Biotechnol. 177: 279–303.

Gagaoua M, Terlouw C, Micol D, Boudjellal A, Hocquette J-F, Picard B. 2015c. Proteomic biomarkers of meat colour of blonde d'aquitaine young bulls: towards a better comprehension of the biological mechanisms. 61th Int. Congr. Meat Sci. Technol. (ICoMST). 2015; 61. Int. Congr. Meat Sci. Technol. (ICoMST), Clermont-Ferrand, FRA, 2015-08-23-2015-08-28, 93-93.

Gagaoua M, Terlouw C, Picard B. 2019. The associations between proteomic biomarkers and beef tenderness depend on the end-point cooking temperature, the country origin of the panelists and breed. Meat Sci. 157.

Gagaoua M, Terlouw EMC, Micol D, Boudjellal A, Hocquette J-F, Picard B. 2015d. 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: 6799–6809.

Gagaoua M, Terlouw EMC, Micol D, Hocquette J-F, Moloney AP, Nuernberg K, Bauchart D, Boudjellal A, Scollan ND, Richardson RI, Picard B. 2016. Sensory quality of meat from eight different types of cattle in relation with their biochemical characteristics. J. Integr. Agric. 15: 1550–1563.

Gam L-H. 2012. Breast cancer and protein biomarkers. World J. Exp. Med. 2: 0.

Garcia S, Baldasso PA, Guest PC, Martins-De-Souza D. 2017. Depletion of highly abundant proteins of the human blood plasma: Applications in proteomics studies of psychiatric disorders. In: Methods in Molecular Biology. Humana Press Inc., p 195–204.

De Gassart A, Géminard C, Février B, Raposo G, Vidal M. 2003. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. Blood 102: 4336–4344.

Gatellier P, Mercier Y, Juin H, Renerre M. 2005. Effect of finishing mode (pasture- or mixed-diet) on lipid composition, colour stability and lipid oxidation in meat from Charolais cattle. Meat Sci. 69: 175–186.

Ge Y, Molloy MP, Chamberlain JS, Andrews PC. 2003. Proteomic analysis of mdx skeletal muscle: Great reduction of adenylate kinase 1 expression and enzymatic activity. Proteomics 3: 1895–1903.

Geay et Renand. 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. Rumin.: 177–182.

Geay Y, Bauchart D, Hocquette JF, Culioli J. 2002. Valeur di??t??tique et qualit??s sensorielles des viandes de ruminants. Incidence de l'alimentation des animaux. Prod. Anim. 15: 37–52.

Gee HY, Noh SH, Tang BL, Kim KH, Lee MG. 2011. Rescue of ΔF508-CFTR Trafficking via a GRASP-Dependent Unconventional Secretion Pathway. Cell 146: 746–760.

Gene V Glass. 2000. Meta-Analysis at 25. Coll. Educ. Arizona State Univ.

Gerke V, Creutz CE, Moss SE. 2005. Annexins: Linking Ca2+ signalling to membrane dynamics. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 6: 449–461.

Gerke V, Moss SE. 2002. Annexins: From structure to function. Physiol. Rev. 82: 331–371.

Gerrard DE, Jones SJ, Aberle ED, Lemenager RP, Diekman MA, Judge MD. 1987. Collagen Stability, Testosterone Secretion and Meat Tenderness in Growing Bulls and Steers. J. Anim. Sci. 65: 1236–1242.

Gettins PGW. 2002. Serpin Structure, Mechanism, and Function.

Geyer PE, Holdt LM, Teupser D, Mann M. 2017. Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics. Mol. Syst. Biol. 13: 942.

Geyer PE, Kulak NA, Pichler G, Holdt LM, Teupser D, Mann M. 2016. Plasma Proteome Profiling to Assess Human Health and Disease. Cell Syst. 2: 185–195.

Di Girolamo F, Righetti PG, Soste M, Feng Y, Picotti P. 2013. Reproducibility of combinatorial peptide ligand libraries for proteome capture evaluated by selected reaction monitoring. J. Proteomics 89: 215–226.

Glancy B, Balaban RS. 2012. Role of Mitochondrial Ca^{2+} in the Regulation of Cellular Energetics. Biochemistry 51: 2959–2973.

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 Sci. 85: 676–683.

Göktürk I, Tamahkar E, Yılmaz F, Denizli A. 2018. Protein depletion with bacterial cellulose nanofibers. J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 1099: 1–9.

Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. 2003. The Calpain System. Physiol. Rev. 83: 731–801.

Gomes-Lima CJ, Maciel AAFL, Andrade M de O, Cunha VS da, Mazzeu JF, Bleicher L, Neves F de AR, Lofrano-Porto A. 2018. Thyroxine-binding globulin deficiency due to a novel SERPINA7 mutation: Clinical characterization, analysis of X-chromosome inactivation pattern and protein structural modeling. Gene 666: 58–63.

van der Goot FG, Gruenberg J. 2006. Intra-endosomal membrane traffic. Trends Cell Biol. 16: 514–521.

Gordon AM, Homsher E, Regnier M. 2000. Regulation of Contraction in Striated Muscle. Physiol. Rev. 80: 853–924.

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: 1652–1657.

Görg A, Weiss W, Dunn MJ. 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. Proteomics 4: 3665–3685.

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 Sci. 82: 300–308.

Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. 2002. Multidrug resistance in cancer: role of ATP–dependent transporters. Nat. Rev. Cancer 2: 48–58.

Grabež V, Kathri M, Phung V, Moe KM, Slinde E, Skaugen M, Saarem K, Egelandsdal B. 2015. Protein expression and oxygen consumption rate of early postmortem mitochondria relate to meat tenderness1. J. Anim. Sci. 93: 1967–1979.

Grieve AG, Rabouille C. 2011. Golgi bypass: skirting around the heart of classical secretion. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 3: a005298.

Grobet L, Royo Martin LJ, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, Schoeberlein A, Dunner S, Ménissier F, Massabanda J, Fries R, Hanset R, Georges M. 1997. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double–muscled phenotype in cattle. Nat. Genet. 17: 71–74.

Grunert KG, Bredahl L, Brunsø K. 2004. Consumer perception of meat quality and implications for product development in the meat sector—a review. Meat Sci. 66: 259–272.

Guerrier L, Righetti PG, Boschetti E. 2008. Reduction of dynamic protein concentration range of biological extracts for the discovery of low-abundance proteins by means of hexapeptide ligand library. Nat. Protoc. 3: 883–890.

Guescini M, Guidolin D, Vallorani L, Casadei L, Gioacchini AM, Tibollo P, Battistelli M, Falcieri E, Battistin L, Agnati LF, Stocchi V. 2010. C2C12 myoblasts release micro-vesicles containing mtDNA and proteins involved in signal transduction. Exp. Cell Res. 316: 1977–1984.

Guillemin N, Bonnet M, Jurie C, Picard B. 2011. Functional analysis of beef tenderness. J. Proteomics 75: 352–365.

Guillemin N, Cassar-Malek I, Hocquette JF, Jurie C, Micol D, Listrat A, Leveziel H, Renand G, Picard B. 2009a. La maîtrise de la tendreté de la viande bovine : Identification de marqueurs biologiques. Prod. Anim. 22: 331–344.

Guillemin N, Cassar Malek I, Hocquette J-F, Jurie C, Micol D, Listrat A, Levéziel H, Renand G, Picard B. 2009b. La maîtrise de la tendreté de la viande bovine : identification de marqueurs biologiques. INRA Prod. Anim. 4 (22), 331-344.

Guillemin NP, 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.

Gundry RL, Fu Q, Jelinek CA, Van Eyk JE, Cotter RJ. 2007. Investigation of an albumin-enriched fraction of human serum and its albuminome. Proteomics - Clin. Appl. 1: 73–88.

Guo B, Zhang ZK, Liang C, Li J, Liu J, Lu A, Zhang BT, Zhang G. 2017. Molecular Communication from Skeletal Muscle to Bone: A Review for Muscle-Derived Myokines Regulating Bone Metabolism. Calcif. Tissue Int. 100: 184–192.

Gupta S. 2003. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review). Int. J. Oncol. 22: 15–20.

Gutteridge JMC. 1994. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. Chem. Biol. Interact. 91: 133–140.

Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R. 2000. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. Proc. Natl. Acad. Sci. 97: 9390–9395.

Hamdan M. 2007. Biomarkers: Analytical Techniques for Discovery.

Hamill RM, McBryan J, McGee C, Mullen AM, Sweeney T, Talbot A, Cairns MT, Davey GC. 2012. Functional analysis of muscle gene expression profiles associated with tenderness and intramuscular fat content in pork. Meat Sci. 92: 440–450.

Hansen S, Therkildsen M, Byrne D V. 2006. Effects of a compensatory growth strategy on sensory and physical properties of meat from young bulls. Meat Sci. 74: 628–643.

Hanzelková Š, Simeonovová J, Hampel D, Dufek A, Šubrt J. 2011. The effect of breed, sex and aging time on tenderness of beef meat. Acta Vet. Brno 80: 191–196.

Harper GS, Allingham PG, Le Feuvre RP. 1999. Changes in connective tissue of M. semitendinosus as a response to different growth paths in steers. Meat Sci. 53: 107–14.

Hébel. 2012. Evolution de la consommation de viande en France: les nouvelles données de l'enquête "comportements et consommations alimentaires en france" (CCAF). Paris. 5p p.

Henne WM, Buchkovich NJ, Emr SD. 2011. The ESCRT Pathway. Dev. Cell 21: 77–91.

Henne WM, Stenmark H, Emr SD. 2013. Molecular mechanisms of the membrane sculpting ESCRT pathway. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 5.

Henning AK, Albrecht D, Riedel K, Mettenleiter TC, Karger A. 2015. An alternative method for serum protein depletion/enrichment by precipitation at mildly acidic pH values and low ionic strength. Proteomics 15: 1935–1940.

Henningsen J, Rigbolt KTG, Blagoev B, Pedersen BK, Kratchmarova I. 2010. Dynamics of the Skeletal Muscle Secretome during Myoblast Differentiation. Mol. Cell. Proteomics 9: 2482–2496.

Henriksen T, Green C, Klarlund Pedersen B. 2012. Myokines in Myogenesis and Health: Ingenta Connect. Recent Pat. Biotechnol. Volume 6,: 167-171(5).

Herrera-Mendez CH, Becila S, Blanchet X, Pelissier P, Delourme D, Coulis G, Sentandreu MA, 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: 2743–2748.

Herrera-Mendez CH, Brémaud L, Coulis G, Pélissier P, Sentandreu MA, Aubry L, Delourme D, Chambon C, Maftah A, Leveziel H, Ouali A. 2006. Purification of the skeletal muscle protein Endopin 1B and characterization of the genes encoding Endopin 1A and 1B isoforms. FEBS Lett. 580: 3477–3484.

Herrera N, Kunze E, Domenech-Perez K, Ribeiro F, Chao M, Calkins C. 2017. The Relationship between Marbling, Superoxide Dismutase, and Beef Tenderness. Meat Muscle Biol. 1: 169–169.

Hessvik NP, Øverbye A, Brech A, Torgersen ML, Jakobsen IS, Sandvig K, Llorente A. 2016. PIKfyve inhibition increases exosome release and induces secretory autophagy. Cell. Mol. Life Sci. 73: 4717–4737.

Hoch T, Begon C, Cassar Malek I, Picard B, Savary-Auzeloux I. 2003. Mécanismes et conséquences de

la croissance compensatrice chez les ruminants. Prod. Anim. 1 (16), 49-59.

Hocquette J, Cassar-Malek I, Listrat A, Jurie C, Jailler R, Picard B. 2005. Evolution des recherches sur le muscle des bovins et la qualité sensorielle de leur viande. II. Influence des facteurs d'élevage sur les caractéristiques musculaires.

Hocquette JF, Ortigues-Marty I, Pethick D, Herpin P, Fernandez X. 1998. Nutritional and hormonal regulation of energy metabolism in skeletal muscles of meat-producing animals. Livest. Prod. Sci. 56: 115–143.

Holdstock J, Aalhus JL, Uttaro BA, López-Campos Ó, Larsen IL, Bruce HL. 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 Sci. 98: 842–849.

Holmgren L, Szeles A, Rajnavölgyi E, Folkman J, Klein G, Ernberg I, Falk KI. 1999. Apoptotic_body_EBV-transfer_Blood1999. Blood 93: 3956–3963.

Honda K, Hayashida Y, Umaki T, Okusaka T, Kosuge T, Kikuchi S, Endo M, Tsuchida A, Aoki T, Itoi T, Moriyasu F, Hirohashi S, Yamada T. 2005. Possible detection of pancreatic cancer by plasma protein profiling. Cancer Res. 65: 10613–10622.

Hortin GL, Sviridov D. 2010. The dynamic range problem in the analysis of the plasma proteome. J. Proteomics 73: 629–636.

Horvatovich P, Franke L, Bischoff R. 2014. Proteomic Studies Related to Genetic Determinants of Variability in Protein Concentrations. J. Proteome Res. 13: 5–14.

Hoshino D, Kirkbride KC, Costello K, Clark ES, Sinha S, Grega-Larson N, Tyska MJ, Weaver AM. 2013. Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior. Cell Rep. 5: 1159–1168.

Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. 2009. Cell death. N. Engl. J. Med. 361: 1570–83.

Hristov M, Erl W, Linder S, Weber PC. 2004. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. Blood 104: 2761–2766.

Hrynaszkiewicz I. 2010. A call for BMC Research Notes contributions promoting best practice in data standardization, sharing and publication. BMC Res. Notes 3: 235.

Hsu C, Morohashi Y, Yoshimura SI, Manrique-Hoyos N, Jung SY, Lauterbach MA, Bakhti M, Grønborg M, Möbius W, Rhee JS, Barr FA, Simons M. 2010. Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. J. Cell Biol. 189: 223–232.

Hu G, Drescher KM, Chen XM. 2012. Exosomal miRNAs: Biological properties and therapeutic potential. Front. Genet. 3.

Huff-Lonergan E, Lonergan SM. 2005. Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. Meat Sci. 71: 194–204.

Huff Lonergan E, Zhang W, Lonergan SM. 2010. Biochemistry of postmortem muscle — Lessons on mechanisms of meat tenderization. Meat Sci. 86: 184–195.

Hugel B, Martínez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. 2005. Membrane microparticles: Two sides of the coin. Physiology 20: 22–27.

Huntington JA. 2011. Serpin structure, function and dysfunction. J. Thromb. Haemost. 9: 26–34.

Huntington JA, Carrell RW. 2001. The Serpins: Nature's Molecular Mousetraps. Sci. Prog. 84: 125–136.

Huntington JA, Read RJ, Carrell RW. 2000. Structure of a serpin–protease complex shows inhibition by deformation. Nature 407: 923–926.

Huotari J, Helenius A. 2011. Endosome maturation. EMBO J. 30: 3481–500.

Hurwitz SN, Conlon MM, Rider MA, Brownstein NC, Meckes DG. 2016. Nanoparticle analysis sheds budding insights into genetic drivers of extracellular vesicle biogenesis. J. Extracell. Vesicles 5: 31295.

Isfort RJ, Wang F, Greis KD, Sun Y, Keough TW, Farrar RP, Bodine SC, Anderson NL. 2002. Proteomic analysis of rat soleus muscle undergoing hindlimb suspension-induced atrophy and reweighting hypertrophy. Proteomics 2: 543–550.

Jesenberger V, Jentsch S. 2002. Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 3: 112–121.

Jia X, Ekman M, Grove H, Færgestad EM, Aass L, Hildrum KI, Hollung K, Xiaohong Jia †,‡, Maria Ekman †, Harald Grove †,‡, Ellen M. Færgestad †, Laila Aass §, Kjell I. Hildrum † and, Kristin Hollung* †. 2007. Proteome Changes in Bovine Longissimus Thoracis Muscle During the Early Postmortem Storage Period. J. Proteome Res. 6: 2720–2731.

Jia X, Hildrum KI, 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: 1763–1769.

Jia X, Hollung K, Therkildsen M, Hildrum KI, Bendixen E. 2006b. Proteome analysis of early post-mortem changes in two bovine muscle types:M. longissimus dorsi andM. semitendinosis. Proteomics 6: 936–944.

Jia X, Veiseth-Kent E, Grove H, Kuziora P, Aass L, Hildrum KI, Hollung K. 2009. Peroxiredoxin-6 A potential protein marker for meat tenderness in bovine longissimus thoracis muscle. J. Anim. Sci. 87: 2391–2399.

Jiang S, Liu Y, Shen Z, Zhou B, Shen QW. 2019. Acetylome profiling reveals extensive involvement of lysine acetylation in the conversion of muscle to meat. J. Proteomics 205: 103412.

Jiang ST. 1998. Contribution of muscle proteinases to meat tenderization. Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China. B. 22: 97–107.

Johnston BC, Zeraatkar D, Han MA, Vernooij RWM, Valli C, El Dib R, Marshall C, Stover PJ, Fairweather-Taitt S, Wójcik G, Bhatia F, de Souza R, Brotons C, Meerpohl JJ, Patel CJ, Djulbegovic B, Alonso-Coello P, Bala MM, Guyatt GH. 2019. Unprocessed Red Meat and Processed Meat Consumption: Dietary Guideline Recommendations From the Nutritional Recommendations (NutriRECS) Consortium. Ann. Intern. Med.

Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. 1987. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). J. Biol. Chem. 262: 9412–20.

Johnstone RM, Mathew A, Mason AB, Teng K. 1991. Exosome formation during maturation of mammalian and avian reticulocytes: Evidence that exosome release is a major route for externalization of obsolete membrane proteins. J. Cell. Physiol. 147: 27–36.

Jones SJ, Starkey DL, Calkins CR, Crouse JD. 1990. Myofibrillar protein turnover in feed-restricted and realimented beef cattle. J. Anim. Sci. 68: 2707.

De Jong OG, Van Balkom BWM, Gremmels H, Verhaar MC. 2016. Exosomes from hypoxic endothelial cells have increased collagen crosslinking activity through up-regulation of lysyl oxidase-like 2. J. Cell. Mol. Med. 20: 342–350.

Joseph P, Suman SP, Rentfrow G, Li S, Beach CM. 2012. Proteomics of Muscle-Specific Beef Color Stability. J. Agric. Food Chem. 60: 3196–3203.

Jung J, Kim J, Roh SH, Jun I, Sampson RD, Gee HY, Choi JY, Lee MG. 2016. The HSP70 co-chaperone DNAJC14 targets misfolded pendrin for unconventional protein secretion. Nat. Commun. 7: 11386.

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. Anim. Sci. 80: 257–263.

Jurie C, Ortigues-Marty I, Picard B, Micol D, Hocquette JF. 2006. The separate effects of the nature of diet and grazing mobility on metabolic potential of muscles from Charolais steers. Livest. Sci. 104: 182–192.

Jurie C, Picard B, Geay Y. 1999. Changes in the metabolic and contractile characteristics of muscle in male cattle between 10 and 16 months of age. Histochem. J. 31: 117–122.

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: 125–135.

Kajimoto T, Okada T, Miya S, Zhang L, Nakamura SI. 2013. Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes. Nat. Commun. 4.

Keerthikumar S. 2016. A catalogue of human secreted proteins and its implications. AIMS Biophys. 3: 563–570.

Kelly R. 1985. Pathways of protein secretion in eukaryotes. Science (80-.). 230: 25–32.

Kemp CM, Parr T. 2012. Advances in apoptotic mediated proteolysis in meat tenderisation. Meat Sci. 92: 252–259.

Kemp CM, Wheeler TL. 2011. Effects of manipulation of the caspase system on myofibrillar protein degradation in vitro12. J. Anim. Sci. 89: 3262–3271.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br. J. Cancer 26: 239–57.

Kerry J (Microbiologist), Ledward D. 2009. Improving the sensory and nutritional quality of fresh meat. Woodhead Pub. 664 p.

Kharaziha P, Ceder S, Li Q, Panaretakis T. 2012. Tumor cell-derived exosomes: A message in a bottle. Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer 1826: 103–111.

Kim G-D, Yang H-S, Jeong J-Y. 2016a. Comparison of Characteristics of Myosin Heavy Chain-based Fiber and Meat Quality among Four Bovine Skeletal Muscles. Korean J. food Sci. Anim. Resour. 36: 819–828.

Kim J, Noh SH, Piao H, Kim DH, Kim K, Cha JS, Chung WY, Cho H-S, Kim JY, Lee MG. 2016b. Monomerization and ER Relocalization of GRASP Is a Requisite for Unconventional Secretion of CFTR. Traffic 17: 733–753.

Kim NK, Cho S, Lee SH, Park HR, Lee CS, Cho YM, Choy YH, Yoon D, Im SK, Park EW. 2008. Proteins in longissimus muscle of Korean native cattle and their relationship to meat quality. Meat Sci. 80: 1068–1073.

Kingsmore SF. 2006. Multiplexed protein measurement: technologies and applications of protein and antibody arrays. Nat. Rev. Drug Discov. 5: 310–321.

Kiran M, Naveena BM, Reddy KS, Shashikumar M, Reddy VR, Kulkarni VV, Rapole S, More TH. 2015. Muscle-Specific Variation in Buffalo (*B ubalus bubalis*) Meat Texture: Biochemical, Ultrastructural and Proteome Characterization. J. Texture Stud. 46: 254–261.

Kitamura Y, Usami R, Ichihara S, Kida H, Satoh M, Tomimoto H, Murata M, Oikawa S. 2017. Plasma protein profiling for potential biomarkers in the early diagnosis of Alzheimer's disease. Neurol. Res. 39: 231–238.

Klont RE, Barnier VM, van Dijk A, Smulders FJ, Hoving-Bolink AH, Hulsegge B, Eikelenboom G. 2000. Effects of rate of pH fall, time of deboning, aging period, and their interaction on veal quality characteristics. J. Anim. Sci. 78: 1845.

Kojic S, Medeot E, Guccione E, Krmac H, Zara I, Martinelli V, Valle G, Faulkner G. 2004. The Ankrd2 protein, a link between the sarcomere and the nucleus in skeletal muscle. J. Mol. Biol. 339: 313–325.

Kojic S, Radojkovic D, Faulkner G. 2011. Muscle ankyrin repeat proteins: Their role in striated muscle function in health and disease. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 48: 269–294.

Koohmaraie M, Kent MP, Shackelford SD, Veiseth E, Wheeler TL. 2002. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? Meat Sci. 62: 345–352.

Kooijman EE, Chupin V, de Kruijff B, Burger KNJ. 2003. Modulation of membrane curvature by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. Traffic 4: 162–174.

Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, Dingli F, Loew D, Tkach M, Théry C. 2016. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 113: E968–E977.

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny M V, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G, Nomenclature Committee on Cell Death 2009. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Cell Death Differ. 16: 3–11.

Kroemer G, Reed JC. 2000. Mitochondrial control of cell death. Nat. Med. 6: 513–519.

Ktistakis NT, Tooze SA. 2016. Digesting the Expanding Mechanisms of Autophagy. Trends Cell Biol. 26: 624–635.

Lakkaraju A, Rodriguez-Boulan E. 2008. Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity. Trends Cell Biol. 18: 199–209.

Lametsch R, Karlsson A, Rosenvold K, Andersen HJ, Roepstorff P, Bendixen E, René Lametsch †, Anders Karlsson †, Katja Rosenvold †, Henrik Jørgen Andersen †, Peter Roepstorff ‡ and, Emøke Bendixen* †. 2003. Postmortem Proteome Changes of Porcine Muscle Related to Tenderness. J. Agric. Food Chem. 51: 6992–6997.

Lametsch R, Roepstorff P, Møller H., Bendixen E. 2004. Identification of myofibrillar substrates for μ-calpain. Meat Sci. 68: 515–521.

Lan J, Núñez Galindo A, Doecke J, Fowler C, Martins RN, Rainey-Smith SR, Cominetti O, Dayon L. 2018. Systematic Evaluation of the Use of Human Plasma and Serum for Mass-Spectrometry-Based Shotgun Proteomics. J. Proteome Res. 17: 1426–1435.

Laporte et Mainsant. 2012. La viande voit rouge. Fayard.

Larzul C, Lefaucheur L, Ecolan P, Gogué 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.

Lata S, Schoehn G, Solomons J, Pires R, Göttlinger HG, Weissenhorn W. 2009. Structure and function of ESCRT-III. Biochem. Soc. Trans. 37: 156–160.

Laville E, Sayd T, Morzel M, Blinet S, Chambon C, Lepetit J, Renand G, Hocquette JF. 2009. Proteome Changes during Meat Aging in Tough and Tender Beef Suggest the Importance of Apoptosis and Protein Solubility for Beef Aging and Tenderization. J. Agric. Food Chem. 57: 10755–10764.

Law RHP, Zhang Q, McGowan S, Buckle AM, Silverman GA, Wong W, Rosado CJ, Langendorf CG, Pike RN, Bird PI, Whisstock JC. 2006. An overview of the serpin superfamily. Genome Biol. 7: 216.

Lawrence DA, Ginsburg D, Day DE, Berkenpas MB, Verhamme IM, Kvassman JO, Shore JD. 1995. Serpin-protease complexes are trapped as stable acyl-enzyme intermediates. J. Biol. Chem. 270: 25309–12.

Lawrence DA, Olson ST, Muhammad S, Day DE, Kvassman JO, Ginsburg D, Shore JD. 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.

Leal LG, Lopes MA, Batista ML. 2018. Physical exercise-induced myokines and muscle-adipose tissue crosstalk: A review of current knowledge and the implications for health and metabolic diseases. Front. Physiol. 9.

Leatherbarrow RJ, Dean PD. 1980. Studies on the mechanism of binding of serum albumins to immobilized cibacron blue F3G A. Biochem. J. 189: 27–34.

Lebret B, Picard B. 2015. Les principales composantes de la qualité des carcasses et des viandes dans les différentes espèces animales.

Lee J-G, Takahama S, Zhang G, Tomarev SI, Ye Y. 2016. Unconventional secretion of misfolded proteins promotes adaptation to proteasome dysfunction in mammalian cells. Nat. Cell Biol. 18: 765–776.

Lee JH, Jun HS. 2019. Role of myokines in regulating skeletal muscle mass and function. Front. Physiol. 10.

Lee PY, Osman J, Low TY, Jamal R. 2019. Plasma/serum proteomics: Depletion strategies for reducing high-abundance proteins for biomarker discovery. Bioanalysis 11: 1799–1812.

Legifrance. 2008. Arrêté du 13 octobre 2008 portant homologation du cahier des charges de l'indication géographique protégée (IGP) « Génisse fleur d'Aubrac » | Legifrance.

Lepetit. 2004. Rôle des tissus conjonctifs dans le déterminisme de la tendreté de la viande. In: In: 10èmes Journées des Sciences du Muscle et Technologies de la Viande C-F, editor., p 15–25.

Lepetit J, Culioli J. 1994. Mechanical properties of meat. Meat Sci. 36: 203–237.

Levine B, Yuan J. 2005. Autophagy in cell death: an innocent convict? J. Clin. Invest. 115: 2679–2688.

Li H, Zhu H, Xu C, Yuan J. 1998. Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. Cell 94: 491–501.

Li L. 2015. Dynamic range compression with proteominer™: Principles and examples. In: Methods in Molecular Biology. Humana Press Inc., p 99–107.

Li P, Nijhawan D, Wang X. 2004. Mitochondrial activation of apoptosis. Cell 116: S57-9, 2 p following S59.

Li S, He Y, Lin Z, Xu S, Zhou R, Liang F, Wang J, Yang H, Liu S, Ren Y. 2017a. Digging More Missing Proteins Using an Enrichment Approach with ProteoMiner. J. Proteome Res. 16: 4330–4339.

Li Z, Rodriguez E, Azaria S, Pekarek A, Hage DS. 2017b. Affinity monolith chromatography: A review of general principles and applications. Electrophoresis 38: 2837–2850.

Lim LC, Looi ML, Syed Zakaria SZ, Sagap I, Rose IM, Chin SF, Jamal R. 2016. Identification of Differentially Expressed Proteins in the Serum of Colorectal Cancer Patients Using 2D-DIGE Proteomics Analysis. Pathol. Oncol. Res. 22: 169–177.

Linton KJ. 2007. Structure and Function of ABC Transporters. Physiology 22: 122–130.

Listrat A, Lebret B, Louveau I, Astruc T, Bonnet M, Lefaucheur L, Bugeon J, Sup V, Ouest A. 2015. Comment la structure et la composition du muscle déterminent la qualité des viandes ou chairs. 28: 125–136.

Listrat A, Lebret B, Louveau I, Astruc T, Bonnet M, Lefaucheur L, Picard B, Bugeon J. 2016. How Muscle Structure and Composition Influence Meat and Flesh Quality. Sci. World J. 2016: 1–14.

Listrat A, Lethias C, Hocquette JF, Renand G, Ménissier F, Geay Y, Picard B. 2000. Age-related Changes and Location of Types I, III, XII and XIV Collagen During Development of Skeletal Muscles from

Genetically Different Animals. Histochem. J. 32: 349–356.

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: 115–124.

Liu G, Zhao Y, Angeles A, Hamuro LL, Arnold ME, Shen JX. 2014. A novel and cost effective method of removing excess albumin from plasma/serum samples and its impacts on LC-MS/MS bioanalysis of therapeutic proteins. Anal. Chem. 86: 8336–8343.

Liu Q, Lanari MC, Schaefer DM. 1995. A review of dietary vitamin E supplementation for improvement of beef quality. J. Anim. Sci. 73: 3131.

Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. Cell 86: 147–57.

Liu Z, Fan S, Liu H, Yu J, Qiao R, Zhou M, Yang Y, Zhou J, Xie P. 2016. Enhanced Detection of Low-Abundance Human Plasma Proteins by Integrating Polyethylene Glycol Fractionation and Immunoaffinity Depletion. PLoS One 11: e0166306.

Liumbruno G, D'Alessandro A, Grazzini G, Zolla L. 2010. Blood-related proteomics. J. Proteomics 73: 483–507.

Lobb RJ, Becker M, Wen Wen S, Wong CSF, Wiegmans AP, Leimgruber A, Möller A. 2015. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. J. Extracell. Vesicles 4: 27031.

Lomiwes D, Farouk MM, Wiklund E, Young OA. 2014. Small heat shock proteins and their role in meat tenderness: A review. Meat Sci. 96: 26–40.

Lucidchart. Lucid Software Inc. Structure de base de données et tutoriel de conception | Lucidchart.

Ludwig A-K, Giebel B. 2012. Exosomes: Small vesicles participating in intercellular communication. Int. J. Biochem. Cell Biol. 44: 11–15.

Lunardi J, Fauré J, Marty I, Monnier N. 2008. Le récepteur de la ryanodine de type I. médecine/sciences 24: 897–899.

Ma Z, Ramakrishna S. 2008. Electrospun regenerated cellulose nanofiber affinity membrane functionalized with protein A/G for IgG purification. J. Memb. Sci. 319: 23–28.

Maas SLN, Breakefield XO, Weaver AM. 2017. Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. Trends Cell Biol. 27: 172–188.

Maccatrozzo L, Patruno M, Toniolo L, Reggiani C, Mascarello F. 2004. Myosin heavy chain 2B isoform is expressed in specialized eye muscles but not in trunk and limb muscles of cattle. Eur. J. Histochem. 48: 357–66.

Maclean LM, O'Toole PJ, Stark M, Marrison J, Seelenmeyer C, Nickel W, Smith DF. 2012. Trafficking and release of Leishmania metacyclic HASPB on macrophage invasion. Cell. Microbiol. 14: 740–61.

Maddur AA, Swanson R, Izaguirre G, Gettins PGW, Olson ST. 2013. Kinetic intermediates en route to the final serpin-protease complex: studies of complexes of α1-protease inhibitor with trypsin. J. Biol. Chem. 288: 32020–35.

Mahn A, Ismail M. 2011. Depletion of highly abundant proteins in blood plasma by ammonium sulfate precipitation for 2D-PAGE analysis. J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 879: 3645–3648.

Malheiros JM, Braga CP, Grove RA, Ribeiro FA, Calkins CR, Adamec J, Chardulo LAL. 2019. Influence of oxidative damage to proteins on meat tenderness using a proteomics approach. Meat Sci. 148: 64–71.

Maltin C, Balcerzak D, Tilley R, Delday M. 2003. Determinants of meat quality: tenderness. Proc. Nutr. Soc. 62: 337–47.

Maltin CA, Warkup CC, Matthews KR, Grant CM, Porter AD, Delday MI. 1997. Pig muscle fibre characteristics as a source of variation in eating quality. Meat Sci. 47: 237–248.

Mancini RA, Hunt MC. 2005. Current research in meat color. Meat Sci. 71: 100–121.

Manjithaya R, Anjard C, Loomis WF, Subramani S. 2010. Unconventional secretion of Pichia pastoris Acb1 is dependent on GRASP protein, peroxisomal functions, and autophagosome formation. J. Cell Biol. 188: 537–46.

Manjithaya R, Subramani S. 2011. Autophagy: a broad role in unconventional protein secretion? Trends Cell Biol. 21: 67–73.

Marino R, Albenzio M, della Malva A, Caroprese M, Santillo A, Sevi A. 2014. Changes in meat quality traits and sarcoplasmic proteins during aging in three different cattle breeds. Meat Sci. 98: 178–186.

Marouga R, David S, Hawkins E. 2005. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. Anal. Bioanal. Chem. 382: 669–678.

Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. 2010. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. J. Proteomics 73: 1907–1920.

Matsubara J, Ono M, Negishi A, Ueno H, Okusaka T, Furuse J, Furuta K, Sugiyama E, Saito Y, Kaniwa N, Sawada J, Honda K, Sakuma T, Chiba T, Saijo N, Hirohashi S, Yamada T. 2009. Identification of a predictive biomarker for hematologic toxicities of gemcitabine. J. Clin. Oncol. 27: 2261–2268.

Mazzeo C, Calvo V, Alonso R, Mérida I, Izquierdo M. 2016. Protein kinase D1/2 is involved in the maturation of multivesicular bodies and secretion of exosomes in T and B lymphocytes. Cell Death Differ. 23: 99–109.

McCormick. 2009. Collagen. In: In Applied Muscle. Biology and Meat Science. M. Du and RJ McCormick, CRC Press. New York, NY, p 128–148.

McCormick R. 1999. Extracellular modifications to muscle collagen: implications for meat quality. Poult. Sci. 78: 785–791.

McDonald WH, Yates JR. 2002. Shotgun proteomics and biomarker discovery. Dis. Markers 18: 99–105.

McGrath JP, Varshavsky A. 1989. The yeast STE6 gene encodes a homologue of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein. Nature 340: 400–404.

McMahon HT, Boucrot E. 2015. Membrane curvature at a glance. J. Cell Sci. 128: 1065–1070.

McPherron AC, Lawler AM, Lee S-J. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-p superfamily member. Nature 387: 83–90.

Mehrani H, Ghanei M, Aslani J, Tabatabaei Z. 2011. Plasma proteomic profile of sulfur mustard exposed lung diseases patients using 2-dimensional gel electrophoresis. Clin. Proteomics 8.

Mekchay S, Teltathum T, Nakasathien S, Pongpaichan P. 2010. Proteomic Analysis of Tenderness Trait in Thai Native and Commercial Broiler Chicken Muscles. J. Poult. Sci. 47: 8–12.

Mellman I, Warren G. 2000. The road taken: past and future foundations of membrane traffic. Cell 100: 99–112.

Micol et al. 2010. Qualités sensorielles de la viande bovine. Impacts des facteurs d'élevage. In: Muscle et viande de ruminant., Quae éditi., p 163–173.

Miller EA, Beilharz TH, Malkus PN, Lee MC., Hamamoto S, Orci L, Schekman R. 2003. Multiple Cargo Binding Sites on the COPII Subunit Sec24p Ensure Capture of Diverse Membrane Proteins into Transport Vesicles. Cell 114: 497–509.

Miller MF, Cross HR, Crouse JD, Jenkins TG. 1987. Effect of feed energy intake on collagen characteristics and muscle quality of mature cows. Meat Sci. 21: 287–294.

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 Radic. Res. 35: 301–310.

Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. Nature 451: 1069–1075.

Moevi I. 2003. La vente directe de viande bovine : Eléments d'information et de réflexion. Compte rendu de l'Institut de l'Elevage n°2033215: 1–114.

Moisá SJ, Aly SS, Lehenbauer TW, Love WJ, Rossitto P V., Van Eenennaam AL, Trombetta SC, Bortoluzzi EM, Hulbert LE. 2019. Association of plasma haptoglobin concentration and other biomarkers with bovine respiratory disease status in pre-weaned dairy calves. J. Vet. Diagnostic Investig. 31: 40–46.

Monastyrskaya K, Babiychuk EB, Draeger A. 2009. The annexins: spatial and temporal coordination of signaling events during cellular stress. Cell. Mol. Life Sci. 66: 2623–2642.

Monin G. 1991. Facteurs biologiques des qualités de la viande bovine.

Monsón F, Sañudo 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: 471–479.

Montgomery JL, Parrish FC, Beitz DC, Horst RL, Huff-Lonergan EJ, Trenkle AH. 2000. The use of vitamin D3 to improve beef tenderness. J. Anim. Sci. 78: 2615.

Moon YH, Cho WK, Lee SS. 2018. Investigation of blood biomarkers related to meat quality and quantity in Hanwoo steers. Asian-Australasian J. Anim. Sci. 31: 1923–1929.

Morgan JB, Savell JW, Hale DS, Miller RK, Griffin DB, Cross HR, Shackelford SD. 1991. National beef tenderness survey. J. Anim. Sci. 69: 3274.

Morganti C, Bonora M, Sbano L, Morciano G, Aquila G, Campo G, Wieckowski MR, Giorgi C, Pinton P. 2018. The mitochondrial permeability transition pore. In: Mitochondrial Biology and Experimental Therapeutics. Springer International Publishing, p 47–73.

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 Sci. 78: 297–304.

Mottram DS. 1998. Flavour formation in meat and meat products: a review. Food Chem. 62: 415–424.

Muhsin-Sharafaldine MR, Saunderson SC, Dunn AC, Faed JM, Kleffmann T, McLellan AD. 2016. Procoagulant and immunogenic properties of melanoma exosomes, microvesicles and apoptotic vesicles. Oncotarget 7: 56279–56294.

Mullen AM, Pannier L, Hamill R. 2009. 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. Elsevier, p 199–224.

Nagaraja TG, Narayanan SK, Stewart GC, Chengappa MM. 2005. Fusobacterium necrophorum infections in animals: Pathogenesis and pathogenic mechanisms. Anaerobe 11: 239–246.

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. J. Biol. Chem. 276: 41237–41244.

Naveena BM, Faustman C, Tatiyaborworntham N, Yin S, Ramanathan R, Mancini RA. 2010. Detection of 4-hydroxy-2-nonenal adducts of turkey and chicken myoglobins using mass spectrometry. Food Chem. 122: 836–840.

Negishi A, Ono M, Handa Y, Kato H, Yamashita K, Honda K, Shitashige M, Satow R, Sakuma T, Kuwabara H, Omura K, Hirohashi S, Yamada T. 2009. Large-scale quantitative clinical proteomics by label-free liquid chromatography and mass spectrometry. Cancer Sci. 100: 514–519.

Newton KG, Gill CO. 1981. The microbiology of DFD fresh meats: A review. Meat Sci. 5: 223–232.

Nickel W. 2003. The mystery of nonclassical protein secretion. Eur. J. Biochem. 270: 2109–2119.

Nickel W, Seedorf M. 2008. Unconventional Mechanisms of Protein Transport to the Cell Surface of Eukaryotic Cells. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 24: 287–308.

Van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. 2018. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 19: 213–228.

Nishimura T. 2015. Role of extracellular matrix in development of skeletal muscle and postmortem aging of meat. Meat Sci. 109: 48–55.

O'Brien MA, Kirby R. 2008. Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. J. Vet. Emerg. Crit. Care 18: 572–585.

O'Farrell PH. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250: 4007–21.

O'Quinn TG, Legako JF, Brooks JC, Miller MF. 2018. Evaluation of the contribution of tenderness,

juiciness, and flavor to the overall consumer beef eating experience1. Transl. Anim. Sci. 2: 26–36.

Oberley TD, Zhong W, Szweda LI, Oberley LW. 2000. Localization of antioxidant enzymes and oxidative damage products in normal and malignant prostate epithelium. Prostate 44: 144–55.

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 Struct. 8.

Ohmine K, Kawaguchi K, Ohtsuki S, Motoi F, Ohtsuka H, Kamiie J, Abe T, Unno M, Terasaki T. 2015. Quantitative Targeted Proteomics of Pancreatic Cancer: Deoxycytidine Kinase Protein Level Correlates to Progression-Free Survival of Patients Receiving Gemcitabine Treatment. Mol. Pharm. 12: 3282–3291.

Ohta S, Ohsawa I, Kamino K, Ando F, Shimokata H. 2004. Mitochondrial ALDH2 Deficiency as an Oxidative Stress. In: Mitochondrial Pathogenesis. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p 36–44.

Olleta and al. 2006. Sensory evaluation of several european cattle breeds. Proc 2nd Seminar of the Scientific-Professional Network on Mediterranean Livestock Farming, Zaragoza (Spain).

Omenn GS, States DJ, Adamski M, Blackwell TW, Menon R, Hermjakob H, Apweiler R, Haab BB, Simpson RJ, Eddes JS, Kapp EA, Moritz RL, Chan DW, Rai AJ, Admon A, Aebersold R, Eng J, Hancock WS, Hefta SA, Meyer H, Paik Y-K, Yoo J-S, Ping P, Pounds J, Adkins J, Qian X, Wang R, Wasinger V, Wu CY, Zhao X, Zeng R, Archakov A, Tsugita A, Beer I, Pandey A, Pisano M, Andrews P, Tammen H, Speicher DW, Hanash SM. 2005. Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: Results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. Proteomics 5: 3226–3245.

Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. 2015. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. Biochem. Biophys. Res. Commun. 460: 72–81.

Osman J, Tan SC, Lee PY, Low TY, Jamal R. 2019. Sudden Cardiac Death (SCD) - Risk stratification and prediction with molecular biomarkers. J. Biomed. Sci. 26.

Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, Moita CF, Schauer K, Hume AN, Freitas RP, Goud B, Benaroch P, Hacohen N, Fukuda M, Desnos C, Seabra MC, Darchen F, Amigorena S, Moita LF, Thery C. 2010. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. Nat. Cell Biol. 12: 19–30.

Otte S, Barlowe C. 2004. Sorting signals can direct receptor-mediated export of soluble proteins into COPII vesicles. Nat. Cell Biol. 6: 1189–1194.

Ouali A. 1990. Meat Tenderization: Possible Causes and Mechanisms. a Review. J. Muscle Foods 1: 129–165.

Ouali A. 1991. Sensory quality of meat as affected by muscle biochemistry and modern technologies. In: Animal Biotechnology and the Quality of Meat Production. Elsevier: Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, p 85–105.

Ouali A, Gagaoua M, Boudida Y, Becila S, Boudjellal A, Herrera-Mendez CH, Sentandreu MA. 2013.

Biomarkers of meat tenderness: Present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanisms involved. Meat Sci. 95: 854–870.

Ouali A, Herrera-Mendez CH, Coulis G, Becila S, Boudjellal A, Aubry L, Sentandreu MA. 2006. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. Meat Sci. 74: 44–58.

Ouali A, Talmant A. 1990. Calpains and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal muscles. Meat Sci. 28: 331–348.

Oury M-P, Dumont R, Jurie C, Hocquette J-F, Picard B. 2010. Specific fibre composition and metabolism of the rectus abdominis muscle of bovine Charolais cattle. BMC Biochem. 11: 12.

Oury MP, 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. Livest. Sci. 111: 242–254.

Palade G. 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. Science (80-.). 189: 347–358.

Palzkill T, Kluwer. 2002. Proteomics, Proteomics. Boston: Kluwer Academic Publishers.

Parolini I, Federici C, Raggi C, Lugini L, Palleschi S, De Milito A, Coscia C, Iessi E, Logozzi M, Molinari A, Colone M, Tatti M, Sargiacomo M, Fais S. 2009. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. J. Biol. Chem. 284: 34211–34222.

Te Pas M, Hoekman A, Smits M. 2011. Biomarkers as management tools for industries in the pork production chain. J. Chain Netw. Sci. 11: 155–166.

Patron M, Raffaello A, Granatiero V, Tosatto A, Merli G, De Stefani D, Wright L, Pallafacchina G, Terrin A, Mammucari C, Rizzuto R. 2013. The mitochondrial calcium uniporter (MCU): molecular identity and physiological roles. J. Biol. Chem. 288: 10750–8.

Pedersen BK. 2013. Muscle as a Secretory Organ. In: Comprehensive Physiology. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., p 1337–1362.

Pedersen BK, Åkerström TCA, Nielsen AR, Fischer CP. 2007. Role of myokines in exercise and metabolism. J. Appl. Physiol. 103: 1093–1098.

Pedersen BK, Febbraio MA. 2012. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. Nat. Rev. Endocrinol. 8: 457–465.

Pelham HR. 2001. SNAREs and the specificity of membrane fusion. Trends Cell Biol. 11: 99–101.

Pelham HR, Rothman JE. 2000. The debate about transport in the Golgi--two sides of the same coin? Cell 102: 713–9.

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.

Pfeffer SR. 2007. Unsolved Mysteries in Membrane Traffic. Annu. Rev. Biochem. 76: 629–645.

Philchenkov a. 2004. Caspases: potential targets for regulating cell death. J. Cell. Mol. Med. 8: 432–44.

Picard B, Allais S, Jurie C, Levéziel H, Journaux L, Renand G. 2009. Une isoforme de chaîne lourde de

myosine particulière, variable entre les races à viande bovines.

Picard B, Berri C, Lefaucheur L, Molette C, Sayd T, Terlouw C. 2010. Skeletal muscle proteomics in livestock production. Briefings Funct. Genomics Proteomics 9: 259–278.

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: 30–36.

Picard B, Gagaoua M. 2020. Meta-proteomics for the discovery of protein biomarkers of beef tenderness: An overview of integrated studies. Food Res. Int. 127: 108739.

Picard B, Gagaoua M. 2017a. Proteomic Investigations of Beef Tenderness. In: Proteomics in Food Science. Elsevier, p 177–197.

Picard B, Gagaoua M. 2017b. Proteomic Investigations of Beef Tenderness. Proteomics Food Sci.: 177–197.

Picard B, Gagaoua M, Al-Jammas M, De Koning L, Valais A, Bonnet M. 2018. Beef tenderness and intramuscular fat proteomic biomarkers: muscle type effect. PeerJ 6: e4891.

Picard B, Gagaoua M, Hollung K. 2017. Gene and Protein Expression as a Tool to Explain/Predict Meat (and Fish) Quality. In: New Aspects of Meat Quality. Elsevier, p 321–354.

Picard B, Gagaoua M, Al Jammas M, Bonnet M. 2019. Beef tenderness and intramuscular fat proteomic biomarkers: Effect of gender and rearing practices. J. Proteomics 200: 1–10.

Picard B, Gagaoua M, Micol D, Cassar-Malek I, Hocquette J-F, Terlouw CEM. 2014. Inverse Relationships between Biomarkers and Beef Tenderness According to Contractile and Metabolic Properties of the Muscle. J. Agric. Food Chem. 62: 9808–9818.

Picard B, Jurie C, Duris MP, Renand G. 2006. Consequences of selection for higher growth rate on muscle fibre development in cattle. Livest. Sci. 102: 107–120.

Picard B, Kammoun M, Gagaoua M, Barboiron C, Meunier B, Chambon C, Cassar-Malek I. 2016. Calcium homeostasis and muscle energy metabolism are modified in HspB1-null mice. Proteomes 4.

Picard B, Kondjoyan A. 2019. La viande : de l'élevage à l'assiette, Presses Un. L'Opportune, editor. Clermont-Ferrand, France.

Picard B, Lebret B, Cassar-Malek I, Liaubet L, Berri C, Le Bihan-Duval E, Hocquette JF, Renand G. 2015a. Recent advances in omic technologies for meat quality management. Meat Sci. 109: 18–26.

Picard B, Lefèvre F, Lebret B, Lefevre F, Lebret B. 2012. Meat and fish flesh quality improvement with proteomic applications. Anim. Front. 2: 18–25.

Picard B, Robelin J, Geay Y. 1995. Influence of castration and postnatal energy restriction on the contractile and metabolic characteristics of bovine muscle.

Picard, Lebret, Malek C, Liaubet, Berri, Bihan-Duval L, Lefèvre, Hocquette, Renand. 2015b. Des marqueurs génomiques au service de la qualité de la viande. INRA Prod. Anim. 28.

Picotti P, Aebersold R. 2012. Selected reaction monitoring-based proteomics: Workflows, potential,

pitfalls and future directions. Nat. Methods 9: 555–566.

Piovesana S, Capriotti AL, Caruso G, Cavaliere C, La Barbera G, Zenezini Chiozzi R, Laganà A. 2016. Labeling and label free shotgun proteomics approaches to characterize muscle tissue from farmed and wild gilthead sea bream (Sparus aurata). J. Chromatogr. A 1428: 193–201.

Piper RC, Katzmann DJ. 2007. Biogenesis and Function of Multivesicular Bodies. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 23: 519–547.

Pisanu S, Biosa G, Carcangiu L, Uzzau S, Pagnozzi D. 2018. Comparative evaluation of seven commercial products for human serum enrichment/depletion by shotgun proteomics. Talanta 185: 213–220.

Plomgaard P, Halban PA, Bouzakri K. 2012. Bimodal impact of skeletal muscle on pancreatic β-cell function in health and disease. Diabetes, Obes. Metab. 14: 78–84.

Polaskova V, Kapur A, Khan A, Molloy MP, Baker MS. 2010. High-abundance protein depletion: Comparison of methods for human plasma biomarker discovery. Electrophoresis 31: 471–482.

Polati R, Menini M, Robotti E, Millioni R, Marengo E, Novelli E, Balzan S, Cecconi D. 2012. Proteomic changes involved in tenderization of bovine Longissimus dorsi muscle during prolonged ageing. Food Chem. 135: 2052–2069.

Praillet C, Grimaud J, Lortat-Jacob H. 1998. Les protéoglycanes. (I) Molécules aux multiples fonctions... futures molécules thérapeutiques ? médecine/sciences 14: 412.

Pulford DJ, Dobbie P, Fraga Vazquez S, Fraser-Smith E, Frost DA, Morris CA. 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 DJ, Fraga Vazquez S, Frost DF, Fraser-Smith E, Dobbie P, Rosenvold K. 2008. The intracellular distribution of small heat shock proteins in post-mortem beef is determined by ultimate pH. Meat Sci. 79: 623–630.

Purslow PP. 2005. Intramuscular connective tissue and its role in meat quality. Meat Sci. 70: 435–447.

Puthenveedu MA, Bachert C, Puri S, Lanni F, Linstedt AD. 2006. GM130 and GRASP65-dependent lateral cisternal fusion allows uniform Golgi-enzyme distribution. Nat. Cell Biol. 8: 238–248.

Puttamallesh VN, Sreenivasamurthy SK, Singh P, Harsha HC, Ganjiwale A, Broor S, Pandey A, Narayana J, Prasad TS. 2013. Proteomic profiling of serum samples from chikungunya-infected patients provides insights into host response. Clin. Proteomics 10: 14.

Rabilloud T, Chevallet M, Luche S, Lelong C. 2010. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. J. Proteomics 73: 2064–2077.

Rabouille C. 2017. Pathways of Unconventional Protein Secretion. Trends Cell Biol. 27: 230–240.

Rabouille C, Klumperman J. 2005. The maturing role of COPI vesicles in intra-Golgi transport. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 6: 812–817.

Rabouille C, Linstedt AD. 2016. GRASP: A Multitasking Tether. Front. Cell Dev. Biol. 4: 1.

Rabouille C, Malhotra V, Nickel W. 2012. Diversity in unconventional protein secretion. J. Cell Sci. 125:

5251–5.

Raposo G, Stoorvogel W. 2013. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. J. Cell Biol. 200: 373–383.

El Rassi Z, Puangpila C. 2017. Liquid-phase based separation systems for depletion, prefractionation, and enrichment of proteins in biological fluids and matrices for in-depth proteomics analysis-An update covering the period 2014-2016. Electrophoresis 38: 150–161.

Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. 2006. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. Leukemia 20: 1487–1495.

Raude. 2008. LA PLACE DE LA VIANDE DANS LE MODÈLE ALIMENTAIRE FRANÇAIS. Vol 43, N°HS1 p19-28 p.

Rechsteiner M, Hill CP. 2005. Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. Trends Cell Biol. 15: 27–33.

Rémond D, Peyron M-A, Savary-Auzeloux I. 2010. Viande et nutrition protéique.

Renand G, Picard B, Touraille C, Berge P, Lepetit J. 2001. Relationships between muscle characteristics and meat quality traits of young Charolais bulls. Meat Sci. 59: 49–60.

Renerre M. 1982. Effect of age and slaughter weight on the color of young bull meat (Friesian and Charolais breeds). Sci. Aliments.

Renerre M. 1990. Factors involved in the discoloration of beef meat. IInternational J. Food Sci. Technol. 25: 613–630.

Renerre M, Anton M, Gatellier P. 1992. Autoxidation of purified myoglobin from two bovine muscles. Meat Sci. 32: 331–342.

Rice SJ, Liu X, Miller B, Joshi M, Zhu J, Caruso C, Gilbert C, Toth J, Reed M, Rassaei N, Das A, Barochia A, El-Bayoumy K, Belani CP. 2015. Proteomic profiling of human plasma identifies apolipoprotein E as being associated with smoking and a marker for squamous metaplasia of the lung. Proteomics 15: 3267–3277.

Rifai N, Gillette MA, Carr SA. 2006. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. Nat. Biotechnol. 24: 971–983.

Righetti PG, Boschetti E. 2015. Sample treatment methods involving combinatorial peptide ligand libraries for improved proteomes analyses. Methods Mol. Biol. 1243: 55–82.

Righetti PG, Candiano G, Citterio A, Boschetti E. 2015. Combinatorial peptide ligand libraries as a "trojan horse" in deep discovery proteomics. Anal. Chem. 87: 293–305.

Robelin J, Casteilla L. 1990. Différenciation, croissance et développement du tissu adipeux. Prod. Anim. 3: 243–252.

Roche S, Tiers L, Provansal M, Seveno M, Piva MT, Jouin P, Lehmann S. 2009. Depletion of one, six, twelve or twenty major blood proteins before proteomic analysis: The more the better? J. Proteomics 72: 945–951.

Roma Pharmacy AP. 2019. The definition of exosome and extracellular vesicles (EV). Qeios.

Romancino DP, Paterniti G, Campos Y, De Luca A, Di Felice V, d'Azzo A, Bongiovanni A. 2013. Identification and characterization of the nano-sized vesicles released by muscle cells. FEBS Lett. 587: 1379–1384.

Rottenberg H, Hoek JB. 2017. The path from mitochondrial ROS to aging runs through the mitochondrial permeability transition pore. Aging Cell 16: 943–955.

Rowe LJ, Maddock KR, Lonergan SM, Huff-Lonergan E. 2004. Oxidative environments decrease tenderization of beef steaks through inactivation of ??-calpain. J. Anim. Sci. 82: 3254–3266.

Ruan W, Lai M. 2007. Actin, a reliable marker of internal control? Clin. Chim. Acta 385: 1–5.

Rung J, Brazma A. 2013. Reuse of public genome-wide gene expression data. Nat. Rev. Genet. 14: 1–11.

Rupinder SK, Gurpreet AK, Manjeet S. 2007. Cell suicide and caspases. Vascul. Pharmacol. 46: 383–393.

Ruusuvuori E, Kaila K. 2014. Carbonic Anhydrases and Brain pH in the Control of Neuronal Excitability. In: Sub-cellular biochemistry., p 271–290.

Saelens X, Festjens N, Walle L Vande, Gurp M van, Loo G van, Vandenabeele P. 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. Oncogene 23: 2861–2874.

Saha K, Bender F, Gizeli E. 2003. Comparative study of IgG binding to proteins G and A: Nonequilibrium kinetic and binding constant determination with the acoustic waveguide device. Anal. Chem. 75: 835–842.

Salimi K, Usta DD, Koçer İ, Çelik E, Tuncel A. 2018. Protein A and protein A/G coupled magnetic SiO2 microspheres for affinity purification of immunoglobulin G. Int. J. Biol. Macromol. 111: 178–185.

Salter AM. 2013. Impact of consumption of animal products on cardiovascular disease, diabetes, and cancer in developed countries. Anim. Front. 3: 20–27.

Salway JG. 2004. Metabolism at a glance. Blackwell Pub. 125 p.

Samali A, Cotter TG. 1996. Heat Shock Proteins Increase Resistance to Apoptosis. Exp. Cell Res. 223: 163–170.

Santucci L, Candiano G, Petretto A, Lavarello C, Bruschi M, Ghiggeri GM, Citterio A, Righetti PG. 2013. Combinatorial ligand libraries as a two-dimensional method for proteome analysis. J. Chromatogr. A 1297: 106–112.

Sarin A, Clerici M, Blatt SP, Hendrix CW, Shearer GM, Henkart PA. 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.

Satoh K, Maniwa T, Oda T, Matsumoto K ichi. 2013. Proteomic profiling for the identification of serum diagnostic biomarkers for abdominal and thoracic aortic aneurysms. Proteome Sci. 11.

Sauer S, Luge T. 2015. Nutriproteomics: Facts, concepts, and perspectives. Proteomics 15: 997–1013.

Sauvant D, Letourneau-Montminy M, Schmidely P, Boval M, Loncke C, Daniel J. 2019. Use and misuse

of meta-analysis in Animal Science. (hal-02181827).

Sauvant D, Schmidely P, Daudin JJ. 2005. Les méta-analyses des données expérimentales : applications en nutrition animale. Prod. Anim. 1 (18), 63-73.

Savina A, Fader CM, Damiani MT, Colombo MI. 2005. Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. Traffic 6: 131–143.

Savina A, Furlán M, Vidal M, Colombo MI. 2003. Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. J. Biol. Chem. 278: 20083–90.

Sawdy JC, Kaiser SA, St-Pierre NR, Wick MP. 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: 421–426.

Saylan Y, Denizli A. 2019. Supermacroporous composite cryogels in biomedical applications. Gels 5.

Schäfer T, Zentgraf H, Zehe C, Brügger B, Bernhagen J, Nickel W. 2004. Unconventional Secretion of Fibroblast Growth Factor 2 Is Mediated by Direct Translocation across the Plasma Membrane of Mammalian Cells. J. Biol. Chem. 279: 6244–6251.

Sensory analysis ISO 6658, 2017.

Sentandreu M., Coulis G, Ouali A. 2002. Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. Trends Food Sci. Technol. 13: 400–421.

Shackelford SD, Koohmaraie M, Miller MF, Crouse JD, Reagan JO. 1991. An evaluation of tenderness of the longissimus muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. J. Anim. Sci. 69: 171–177.

Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. 2003. Cytoscape: A software Environment for integrated models of biomolecular interaction networks. Genome Res. 13: 2498–2504.

Sierra V, Oliván M. 2013. Role of mitochondria on muscle cell death and meat tenderization. Recent Pat. Endocr. Metab. Immune Drug Discov. 7: 120–9.

Sihlbom C, Kanmert I, Bahr H von, Davidsson P. 2008. Evaluation of the Combination of Bead Technology with SELDI-TOF-MS and 2-D DIGE for Detection of Plasma Proteins. J. Proteome Res. 7: 4191–4198.

Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PG, Irving JA, Lomas DA, Luke CJ, Moyer RW, Pemberton PA, Remold-O'Donnell E, Salvesen GS, Travis J, Whisstock JC. 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: 33293–6.

Simes RJ. 1986. Publication bias: the case for an international registry of clinical trials. J. Clin. Oncol. 4: 1529–1541.

Sinclair KD, Lobley GE, Horgan GW, Kyle DJ, Porter AD, Matthews KR, Warkup CC, Maltin CA. 2001. Factors influencing beef eating quality 1. Effects of nutritional regimen and genotype on

organoleptic properties and instrumental texture. Anim. Sci. 72: 269–277.

Sinha S, Hoshino D, Hong NH, Kirkbride KC, Grega-Larson NE, Seiki M, Tyska MJ, Weaver AM. 2016. Cortactin promotes exosome secretion by controlling branched actin dynamics. J. Cell Biol. 214: 197–213.

Skotland T, Sandvig K, Llorente A. 2017. Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. Prog. Lipid Res. 66: 30–41.

Smith MPW, Wood SL, Zougman A, Ho JTC, Peng J, Jackson D, Cairns DA, Lewington AJP, Selby PJ, Banks RE. 2011. A systematic analysis of the effects of increasing degrees of serum immunodepletion in terms of depth of coverage and other key aspects in top-down and bottom-up proteomic analyses. Proteomics 11: 2222–2235.

Smith VL, Jackson L, Schorey JS. 2015. Ubiquitination as a Mechanism To Transport Soluble Mycobacterial and Eukaryotic Proteins to Exosomes. J. Immunol. 195: 2722–2730.

Smulders F, Hofbauer P, Geesink GH. 2014. The Conversion of Muscle to Meat. In: Meat Inspection and Control in the Slaughterhouse. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, p 399–421.

Sorbolini S, Marras G, Gaspa G, Dimauro C, Cellesi M, Valentini A, Macciotta NP. 2015. Detection of selection signatures in Piemontese and Marchigiana cattle, two breeds with similar production aptitudes but different selection histories. Genet. Sel. Evol. 47.

Soulat J. 2017. Pilotage conjoint, à partir des pratiques d'élevage, des caractéristiques de la carcasse et de la viande de bovins.

Soulat J, Picard B, Léger S, Ellies-Oury M-P, Monteils V. 2018. Preliminary Study to Determinate the Effect of the Rearing Managements Applied during Heifers' Whole Life on Carcass and Flank Steak Quality. Foods 7: 160.

Squier MKT, Miller ACK, Malkinson AM, Cohen JJ. 1994. Calpain activation in apoptosis. J. Cell. Physiol. 159: 229–237.

Srinivas PR, Verma M, Zhao Y, Srivastava S. 2002. Proteomics for cancer biomarker discovery. Clin. Chem. 48: 1160–1169.

Staal J, Bekaert T, Beyaert R. 2011. Regulation of NF-κB signaling by caspases and MALT1 paracaspase. Cell Res. 21: 40–54.

States DJ, Omenn GS, Blackwell TW, Fermin D, Eng J, Speicher DW, Hanash SM. 2006. Challenges in deriving high-confidence protein identifications from data gathered by a HUPO plasma proteome collaborative study. Nat. Biotechnol. 24: 333–338.

Stefanovic S, Hegde RS. 2007. Identification of a Targeting Factor for Posttranslational Membrane Protein Insertion into the ER. Cell 128: 1147–1159.

Stenmark H. 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 10: 513–525.

Stennicke H, Salvesen G. 1999. Catalytic properties of the caspases. Cell Death Differ. 6: 1054–1059.

Stennicke HR, Salvesen GS. 2000. Caspase Assays. Methods Enzymol. 322: 91–100.

Steringer JP, Müller H-M, Nickel W. 2015. Unconventional Secretion of Fibroblast Growth Factor 2—A Novel Type of Protein Translocation across Membranes? J. Mol. Biol. 427: 1202–1210.

Strimbu K, Tavel JA. 2010. What are biomarkers? Curr. Opin. HIV AIDS 5: 463–466.

Stuffers S, Brech A, Stenmark H. 2009a. ESCRT proteins in physiology and disease. Exp. Cell Res. 315: 1619–1626.

Stuffers S, Sem Wegner C, Stenmark H, Brech A. 2009b. Multivesicular Endosome Biogenesis in the Absence of ESCRTs. Traffic 10: 925–937.

Sun D, Zhang H, Guo D, Sun A, Wang H. 2013a. Shotgun Proteomic Analysis of Plasma from Dairy Cattle Suffering from Footrot: Characterization of Potential Disease-Associated Factors. PLoS One 8.

Sun D, Zhuang X, Zhang S, Deng Z Bin, Grizzle W, Miller D, Zhang HG. 2013b. Exosomes are endogenous nanoparticles that can deliver biological information between cells. Adv. Drug Deliv. Rev. 65: 342–347.

Sun X-M, Butterworth M, MacFarlane M, Dubiel W, Ciechanover A, Cohen GM. 2004. Caspase Activation Inhibits Proteasome Function during Apoptosis. Mol. Cell 14: 81–93.

Susanne K. Pedersen †, Jenny L. Harry †, Lucille Sebastian †, Jasmine Baker †, Mathew D. Traini †, John T. McCarthy †, Abi Manoharan †, Marc R. Wilkins †, Andrew A. Gooley †, Pier Giorgio Righetti ‡, Nicolle H. Packer †, Keith L. Williams † and, Ben R. Herbert* †. 2003. Unseen Proteome: Mining Below the Tip of the Iceberg To Find Low Abundance and Membrane Proteins.

Swanek SS, Morgan JB, Owens FN, Gill DR, Strasia CA, Dolezal HG, Ray FK. 1999. Vitamin D3 supplementation of beef steers increases longissimus tenderness. J. Anim. Sci. 77: 874.

Takano J, Tomioka M, Tsubuki S, Higuchi M, Iwata N, Itohara S, Maki M, Saido TC. 2005. Calpain mediates excitotoxic DNA fragmentation via mitochondrial pathways in adult brains: evidence from calpastatin mutant mice. J. Biol. Chem. 280: 16175–84.

Tamahkar E, Babaç C, Kutsal T, Pişkin E, Denizli A. 2010. Bacterial cellulose nanofibers for albumin depletion from human serum. Process Biochem. 45: 1713–1719.

Tassy C, Herrera-Mendez CH, Sentandreu MA, Aubry L, Brémaud L, Pélissier P, Delourme D, Brillard M, Gauthier F, Levéziel 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: 273–280.

Temmerman K, Ebert AD, Müller H-M, Sinning I, Tews I, Nickel W. 2008. A Direct Role for Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in Unconventional Secretion of Fibroblast Growth Factor 2. Traffic 9: 1204–1217.

Teoh SSY, Whisstock JC, Bird PI. 2010. Maspin (SERPINB5) is an obligate intracellular serpin. J. Biol. Chem. 285: 10862–9.

Terlouw C. 2015. Stress reactivity, stress at slaughter and meat quality. In: In Meat Quality: Genetic and Environmental Factors; New York, NY, USA: CRC Press, p 105.

Terlouw C, Berne A, Astruc T. 2009. Effect of rearing and slaughter conditions on behaviour, physiology and meat quality of Large White and Duroc-sired pigs. Livest. Sci. 122: 199–213.

Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. 2006. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. Curr. Protoc. Cell Biol. 30: 3.22.1-3.22.29.

Théry C, Ostrowski M, Segura E. 2009. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. Nat. Rev. Immunol. 9: 581–593.

Thomas KJ, McCoy MK, Blackinton J, Beilina A, van der Brug M, Sandebring A, Miller D, Maric D, Cedazo-Minguez A, Cookson MR. 2011. DJ-1 acts in parallel to the PINK1/parkin pathway to control mitochondrial function and autophagy. Hum. Mol. Genet. 20: 40–50.

Thorburn A. 2004. Death receptor-induced cell killing. Cell. Signal. 16: 139–144.

Thou shalt share your data. 2008. Nat. Methods 5: 209–209.

Thulasiraman V, Lin S, Gheorghiu L, Lathrop J, Lomas L, Hammond D, Boschetti E. 2005. Reduction of the concentration difference of proteins in biological liquids using a library of combinatorial ligands. Electrophoresis 26: 3561–3571.

Tinggi U. 2008. Selenium: its role as antioxidant in human health. Environ. Health Prev. Med. 13: 102–8.

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 caractbristiques musculaires sur les qualites organoleptiques des viandes Influence. Renc. Rech. Rumin.: 169–176.

Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, Schwille P, Brugger B, Simons M. 2008a. Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes. Science (80-.). 319: 1244–1247.

Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, Schwille P, Brügger B, Simons M. 2008b. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. Science (80-.). 319: 1244–1247.

Travis J, Bowen J, Tewksbury D, Johnson D, Pannell R. 1976. Isolation of albumin from whole human plasma and fractionation of albumin depleted plasma. Biochem. J. 157: 301–306.

Tucher C, Bode K, Schiller P, Claßen L, Birr C, Souto-Carneiro MM, Blank N, Lorenz HM, Schiller M. 2018. Extracellular vesicle subtypes released from activated or apoptotic T-lymphocytes carry a specific and stimulus-dependent protein cargo. Front. Immunol. 9.

Tucker WC, Chapman ER. 2002. Role of synaptotagmin in Ca2+-triggered exocytosis. Biochem. J. 366: 1–13.

UEDA K. 2011. ABC Proteins Protect the Human Body and Maintain Optimal Health. Biosci. Biotechnol. Biochem. 75: 401–409.

Underwood KR, Means WJ, Du M. 2008. Caspase 3 is not likely involved in the postmortem tenderization of beef muscle. J. Anim. Sci. 86: 960–966.

Valapala M, Vishwanatha JK. 2011. Lipid raft endocytosis and exosomal transport facilitate extracellular trafficking of annexin A2. J. Biol. Chem. 286: 30911–30925.

van Niel G, Charrin S, Simoes S, Romao M, Rochin L, Saftig P, Marks MS, Rubinstein E, Raposo G. 2011. The Tetraspanin CD63 Regulates ESCRT-Independent and -Dependent Endosomal Sorting during Melanogenesis. Dev. Cell 21: 708–721.

Vaudel M, Verheggen K, Csordas A, Raeder H, Berven FS, Martens L, Vizcaíno JA, Barsnes H. 2016. Exploring the potential of public proteomics data. Proteomics 16: 214–225.

La Venuta G, Zeitler M, Steringer JP, Müller H-M, Nickel W. 2015. The Startling Properties of Fibroblast Growth Factor 2: How to Exit Mammalian Cells without a Signal Peptide at Hand. J. Biol. Chem. 290: 27015–20.

Verbeke W, Van Wezemael L, de Barcellos MD, Kügler JO, Hocquette J-F, Ueland Ø, Grunert KG. 2010. European beef consumers' interest in a beef eating-quality guarantee. Appetite 54: 289–296.

Vercauteren FGG, Arckens L, Quirion R. 2007. Applications and current challenges of proteomic approaches, focusing on two-dimensional electrophoresis. Amino Acids 33: 405–414.

Verma RP, Hansch C. 2007. Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical–biological functions and (Q)SARs. Bioorg. Med. Chem. 15: 2223–2268.

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.

Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Madrid F, Mittelbrunn M. 2014. Sorting it out: Regulation of exosome loading. Semin. Cancer Biol. 28: 3–13.

Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Mittelbrunn M, Fernández-Delgado I, Torralba D, Moreno-Gonzalo O, Baldanta S, Enrich C, Guerra S, Sánchez-Madrid F. 2016. ISGylation controls exosome secretion by promoting lysosomal degradation of MVB proteins. Nat. Commun. 7.

Vitzthum F, Behrens F, Anderson NL, Shaw JH. 2005. Proteomics: From Basic Research to Diagnostic Application. A Review of Requirements & Needs †. J. Proteome Res. 4: 1086–1097.

Volatier J, Dufour A. 2006. LA PLACE DE LA VIANDE ET DES PRODUITS A BASE DE VIANDE COMME ALIMENTS-VECTEURS DANS LES APPORTS NUTRITIONNELS DE LA POPULATION FRANÇAISE.

Walter P, Blobel G. 1982. Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. Nature 299: 691–698.

Wang KK. 2000. Calpain and caspase: can you tell the difference? Trends Neurosci. 23: 20–6.

Wang KKW, Posmantur R, Nadimpalli R, Nath R, Mohan P, Nixon RA, Talanian R V., Keegan M, Herzog L, Allen H. 1998. Caspase-Mediated Fragmentation of Calpain Inhibitor Protein Calpastatin during Apoptosis. Arch. Biochem. Biophys. 356: 187–196.

Warder SE, Tucker LA, Strelitzer TJ, McKeegan EM, Meuth JL, Jung PM, Saraf A, Singh B, Lai-Zhang J, Gagne G, Rogers JC. 2009. Reducing agent-mediated precipitation of high-abundance plasma proteins. Anal. Biochem. 387: 184–193.

Wewer Albrechtsen NJ, Geyer PE, Doll S, Treit P V., Bojsen-Møller KN, Martinussen C, Jørgensen NB, Torekov SS, Meier F, Niu L, Santos A, Keilhauer EC, Holst JJ, Madsbad S, Mann M. 2018. Plasma Proteome Profiling Reveals Dynamics of Inflammatory and Lipid Homeostasis Markers after Roux-En-Y Gastric Bypass Surgery. Cell Syst. 7: 601-612.e3.

Whisstock JC, Bottomley SP. 2006. Molecular gymnastics: serpin structure, folding and misfolding. Curr. Opin. Struct. Biol. 16: 761–768.

Whitham M, Parker BL, Friedrichsen M, Hingst JR, Hjorth M, Hughes WE, Egan CL, Cron L, Watt KI, Kuchel RP, Jayasooriah N, Estevez E, Petzold T, Suter CM, Gregorevic P, Kiens B, Richter EA, James DE, Wojtaszewski JFP, Febbraio MA. 2018. Extracellular Vesicles Provide a Means for Tissue Crosstalk during Exercise. Cell Metab. 27: 237-251.e4.

Wilkins MR, Sanchez J-C, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL. 1996. Progress with Proteome Projects: Why all Proteins Expressed by a Genome Should be Identified and How To Do It. Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 13: 19–50.

Wilson LL, Egan CL, Henning WR, Mills EW, Drake TR. 1995. Effects of live animal performance and hemoglobin level on special-fed veal carcass characteristics. Meat Sci. 41: 89–96.

Wolf P. 1967. The nature and significance of platelet products in human plasma. Br. J. Haematol. 13: 269–288.

Wood DE, Thomas A, Devi LA, Berman Y, Beavis RC, Reed JC, Newcomb EW. 1998. Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis. Oncogene 17: 1069–1078.

Wood W, Turmaine M, Weber R, Camp V, Maki RA, McKercher SR, Martin P. 2000. Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos. Development 127: 5245–52.

Wu W, Fu Y, Therkildsen M, Li X-M, Dai R-T. 2015. Molecular Understanding of Meat Quality Through Application of Proteomics. Food Rev. Int. 31: 13–28.

Wu W, Yu Q-QQ, Fu Y, Tian X-JJ, Jia F, Li X-MM, Dai R-TT. 2016. Towards muscle-specific meat color stability of Chinese Luxi yellow cattle: A proteomic insight into post-mortem storage. J. Proteomics 147: 108–118.

Yamashita H, Avraham S, Jiang S, London R, Van Veldhoven PP, Subramani S, Rogers RA, Avraham H. 1999. Characterization of Human and Murine PMP20 Peroxisomal Proteins That Exhibit Antioxidant Activity *in Vitro*. J. Biol. Chem. 274: 29897–29904.

Yan W, Chen SS. 2005. Mass spectrometry-based quantitative proteomic profiling. Briefings Funct. Genomics Proteomics 4: 27–38.

Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J, Colás E, Cordeiro-Da Silva A, Fais S, Falcon-Perez JM, Ghobrial IM, Giebel B, Gimona M, Graner M, Gursel I, Gursel M, Heegaard NHH, Hendrix A, Kierulf P, Kokubun K, Kosanovic M, Kralj-Iglic V, Krämer-Albers EM, Laitinen S, Lässer C, Lener T, Ligeti E, Line A, Lipps G, Llorente A, Lötvall J, Manček-Keber M, Marcilla A, Mittelbrunn M, Nazarenko I, Nolte-'t Hoen ENM, Nyman TA, O'Driscoll L, Olivan M, Oliveira C, Pállinger É, Del Portillo HA, Reventós J, Rigau M, Rohde E, Sammar M, Sánchez-Madrid F, Santarém N, Schallmoser K,

Ostenfeld MS, Stoorvogel W, Stukelj R, Van Der Grein SG, Helena Vasconcelos M, Wauben MHM, De Wever O. 2015. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. J. Extracell. Vesicles 4: 1–60.

Yang C, Liu YR, Zhang Y, Wang J, Tian LL, Yan YN, Cao WQ, Wang YY. 2017. Depletion of abundant human serum proteins by per se imprinted cryogels based on sample heterogeneity. Proteomics 17.

Yang HH, Lu KH, Lin YF, Tsai SH, Chakraborty S, Zhai WJ, Tai DF. 2013. Depletion of albumin and immunoglobulin G from human serum using epitope-imprinted polymers as artificial antibodies. J. Biomed. Mater. Res. - Part A 101 A: 1935–1942.

Yang Y, Huang J, Rabii B, Rabii R, Hu S. 2014. Quantitative proteomic analysis of serum proteins from oral cancer patients: Comparison of two analytical methods. Int. J. Mol. Sci. 15: 14386–14395.

Yeh W-C, Itie A, Elia AJ, Ng M, Shu H-B, Wakeham A, Mirtsos C, Suzuki N, Bonnard M, Goeddel D V, Mak TW. 2000. Requirement for Casper (c-FLIP) in Regulation of Death Receptor–Induced Apoptosis and Embryonic Development. Immunity 12: 633–642.

Yoo J-S, Moyer BD, Bannykh S, Yoo H-M, Riordan JR, Balch WE. 2002. Non-conventional trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator through the early secretory pathway. J. Biol. Chem. 277: 11401–9.

Zamora F, Aubry L, Sayd T, Lepetit J, Lebert A, Sentandreu MA, Ouali A. 2005. Serine peptidase inhibitors, the best predictor of beef ageing amongst a large set of quantitative variables. Meat Sci. 71: 730–742.

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: 321–333.

Zapata I, Zerby HN, Wick M. 2009. Functional proteomic analysis predicts beef tenderness and the tenderness differential. J. Agric. Food Chem. 57: 4956–4963.

Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. 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 Radic. Biol. Med. 33: 337–49.

Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, Hristov M, Köppel T, Jahantigh MN, Lutgens E, Wang S, Olson EN, Schober A, Weber C. 2009. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. Sci. Signal. 2.

Zhang H, Liu AY, Loriaux P, Wollscheid B, Zhou Y, Watts JD, Aebersold R. 2007. Mass spectrometric detection of tissue proteins in plasma. Mol. Cell. Proteomics 6: 64–71.

Zhang J, Li M, Yu Q, Han L, Ma Z. 2019. Effects of Lysosomal–Mitochondrial Apoptotic Pathway on Tenderness in Post-Mortem Bovine *Longissimus* Muscle. J. Agric. Food Chem. 67: 4578–4587.

Zhang M, Kenny SJ, Ge L, Xu K, Schekman R. 2015. Translocation of interleukin-1β into a vesicle intermediate in autophagy-mediated secretion. Elife 4.

Zhao YM, Basu U, Dodson M V, Basarb JA, Guan LL. 2010. Proteome differences associated with fat accumulation in bovine subcutaneous adipose tissues. Proteome Sci. 8: 14.

Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. 2001. The machinery of programmed cell death. Pharmacol. Ther. 92: 57–70.

Zolotarjova N, Martosella J, Nicol G, Bailey J, Boyes BE, Barrett WC. 2005. Differences among techniques for high-abundant protein depletion. Proteomics 5: 3304–3313.

Zwaal RFA, Schroit AJ. 1997. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. Blood 89: 1121–1132.

Zweig MH, Campbell G. 1993. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. Clin. Chem. 39: 561–77.

Annexes

Annexe 1 : regroupement sémantique REVIGO (Muscle RA)

GO terms	Function	ID Gene Name	Enrichment in Dataset (%)	Enrichment in Genome Database (%)	P-Value adjusted	REVIGO GO regroupment
GO:0008360	regulation of cell shape	RDX TPM1	0.640%	-4.955	0.000	regulation of cell shape
GO:0003009	skeletal muscle contraction	TNNT3 ATP2A2 TNNI2	0.006%	5.015	0.055	skeletal muscle contraction
> GO:0030049	muscle filament sliding	TPM1 TNNI2 TNNT3	0.001%	null	0.704	skeletal muscle contraction
> GO:0006936	muscle contraction	TPM1 TNNT3 TNNI2	0.066%	null	0.841	skeletal muscle contraction
> GO:0060048	cardiac muscle contraction	TNNT3 TNNI2 TPM1	0.022%	null	0.909	skeletal muscle contraction
> GO:0006937	regulation of muscle contraction	TPM1 TNNT3 TNNI2	0.031%	null	0.928	skeletal muscle contraction
GO:0045214	sarcomere organization	TPM1 TNNT3 ANKRD1	0.013%	-4.956	0.652	sarcomere organization

Annexe 2 : regroupement sémantique REVIGO (Muscle LM)

GO terms	Function	ID Gene Name	Enrichment in Dataset (%)	Enrichment in Genome Database (%)	P-Value adjusted	REVIGO GO regroupment
GO:0006914	autophagy	EPM2A STBD1 PARK7	0.230%	0.939	0.024	autophagy
GO:0007339	binding of sperm to zona pellucida	HSPA1L VDAC2 ALDOA	0.007%	0.850	0.019	actin cytoskeleton organization
GO:0048041	focal adhesion assembly	ACTN2 ACTN3	0.012%	0.774	0.101	actin cytoskeleton organization
GO:0030036	actin cytoskeleton organization	SMTNL1 CAPZB PDLIM1 CSRP3 PDLIM7	0.381%	0.688	0.334	actin cytoskeleton organization
GO:0070527	platelet aggregation	HBB HSPB1 VCL	0.011%	0.550	0.571	actin cytoskeleton organization
GO:0005975	carbohydrate metabolic process	STBD1 GPI PGM1 LDHB EPM2A GPD1 GLO1 ALDH2	5.260%	0.943	0.000	carbohydrate metabolism
GO:0006069	ethanol oxidation	ALDH2 ALDH1A1	0.017%	0.848	0.045	ethanol oxidation
GO:0055114	oxidation-reduction process	ALDH2 GPD1 MGST3 ALDH1A1 LDHB NNT OGDH	15.060%	0.834	0.149	ethanol oxidation
GO:0009438	methylglyoxal metabolic process	GLO1 PARK7	0.033%	0.809	0.192	ethanol oxidation
GO:0006103	2-oxoglutarate metabolic process	OGDH GOT1	0.020%	0.795	0.194	ethanol oxidation
GO:0006094	gluconeogenesis	GPI GPD1 PGAM2 SLC25A11 GOT1 ENO2 ENO3 PGM1 ALDOA	0.262%	0.771	0.229	ethanol oxidation
GO:0046034	ATP metabolic process	AK1 MYH7 OLA1	1.263%	0.728	0.311	ethanol oxidation
GO:0005980	glycogen catabolic process	STBD1 PGM1	0.035%	0.746	0.520	ethanol oxidation
GO:0006531	aspartate metabolic process	GOT1 ADSSL1	0.018%	0.794	0.529	ethanol oxidation
GO:0061621	canonical glycolysis	PGAM2 ALDOA ENO3 GPI ENO2	0.001%	0.753	0.629	ethanol oxidation
GO:0006099	tricarboxylic acid cycle	OGDH NNT	0.469%	0.721	0.659	ethanol oxidation
GO:1901687	glutathione derivative biosynthetic process	MGST3 GSTP1	0.000%	0.848	0.082	glutathione derivative biosynthesis
GO:0042026	protein refolding	HSPA1L HSP90AA1	0.069%	0.941	0.000	protein refolding
GO:0050821	protein stabilization	HSP90AA1 CRYAB PARK7	0.045%	0.858	0.000	protein stabilization
GO:2000291	regulation of myoblast proliferation	KLHL41 ANKRD2	0.002%	0.849	0.137	protein stabilization
GO:0006469	negative regulation of protein kinase activity	PARK7 GSTP1 HSPB1	0.074%	0.782	0.169	protein stabilization
GO:0046716	muscle cell cellular homeostasis	ALDOA CFL2	0.006%	0.768	0.375	protein stabilization
GO:0070885	negative regulation of calcineurin-NFAT signaling cascade	MYOZ1 MYOZ2 ACTN3	0.001%	0.775	0.418	protein stabilization
GO:0045662	negative regulation of myoblast differentiation	ANKRD2 CSRP3	0.005%	0.599	0.458	protein stabilization
GO:0030308	negative regulation of cell growth	CRYAB MYL2 FHL1	0.030%	0.692	0.513	protein stabilization
GO:0043066	negative regulation of apoptotic process	CRYAB GSTP1 NNT ALB GLO1 PARK7 HSPB1	0.173%	0.727	0.579	protein stabilization
GO:0001895	retina homeostasis	ALB HSPB1	0.015%	0.627	0.679	protein stabilization
GO:0006898	receptor-mediated endocytosis	HPX HBB ALB PDLIM7 HSP90AA1	0.095%	0.925	0.000	receptor-mediated endocytosis
GO:0043268	positive regulation of potassium ion transport	ACTN2 FHL1	0.006%	0.869	0.172	receptor-mediated endocytosis
GO:0045429	positive regulation of nitric oxide biosynthetic process	HBB HSP90AA1	0.007%	0.846	0.411	receptor-mediated endocytosis
GO:0002576	platelet degranulation	ACTN2 ALB ALDOA OLA1 VCL	0.003%	0.815	0.511	receptor-mediated endocytosis
GO:0042542	response to hydrogen peroxide	CRYAB HBB PARK7	0.029%	0.887	0.000	response to hydrogen peroxide
GO:0043503	skeletal muscle fiber adaptation	ACTA1 MYOZ2 MYOZ1	0.000%	0.646	0.175	response to hydrogen peroxide
GO:1900034	regulation of cellular response to heat	HSPA1L CRYAB HSP90AA1	0.004%	0.816	0.321	response to hydrogen peroxide
GO:0006986	response to unfolded protein	HSPB1 HSPA1L HSP90AA1	0.037%	0.886	0.421	response to hydrogen peroxide
GO:0002026	regulation of the force of heart contraction	CSRP3 MYL2 MYH7	0.005%	0.630	0.437	response to hydrogen peroxide
GO:0007507	heart development	PDLIM7 PDLIM1 MYL2 CSRP3	0.127%	0.584	0.440	response to hydrogen peroxide
GO:0098869	cellular oxidant detoxification	HBB GSTP1 ALB MGST3 PARK7 NNT	0.784%	0.859	0.530	response to hydrogen peroxide

Annexe 3 : regroupement sémantique REVIGO (Plasma RA)

GO terms	Function	ID Gene Name	Enrichment in Dataset (%)	Enrichment in Genome Database (%)	P-Value adjusted	REVIGO GO regroupment
GO:0006888	ER to Golgi vesicle-mediated transport	PROC F7	0.125%	-4.638	0.904	ER to Golgi vesicle-mediated transport
GO:0051621	regulation of norepinephrine uptake	ACTB	0.000%	-6.192	0.779	ER to Golgi vesicle-mediated transport
GO:0002605	negative regulation of dendritic cell antigen processing and presentation	THBS1	0.000%	-4.152	0.699	negative regulation of dendritic cell antigen processing and presentation
GO:0007599	hemostasis	F7 PROC	0.049%	-3.791	0.696	negative regulation of dendritic cell antigen processing and presentation
> GO:0007596	blood coagulation	F7 PROC	0.048%	null	0.570	negative regulation of dendritic cell antigen processing and presentation
> GO:0030194	positive regulation of blood coagulation	F7 THBS1 PRDX2	0.005%	null	0.524	negative regulation of dendritic cell antigen processing and presentation
GO:2000098	negative regulation of smooth muscle cell-matrix adhesion	APOD	0.000%	-3.371	0.671	negative regulation of dendritic cell antigen processing and presentation
GO:0051895	negative regulation of focal adhesion assembly	APOD THBS1	0.003%	null	0.630	negative regulation of dendritic cell antigen processing and presentation
GO:0060588	negative regulation of lipoprotein lipid oxidation	APOD	0.000%	-3.348	0.650	negative regulation of dendritic cell antigen processing and presentation
GO:0043066	negative regulation of apoptotic process	PRDX2 THBS1 PROC	0.173%	-3.664	0.604	negative regulation of dendritic cell antigen processing and presentation
> GO:2001237	negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway	PRDX2 THBS1	0.020%	null	0.472	negative regulation of dendritic cell antigen processing and presentation
GO:2000405	negative regulation of T cell migration	APOD	0.000%	-4.727	0.650	negative regulation of dendritic cell antigen processing and presentation
GO:0098974	postsynaptic actin cytoskeleton organization	ACTB	0.000%	3.600	0.850	postsynaptic actin cytoskeleton organization
GO:1905344	prostaglandin catabolic process	Q9Z1Q2	0.000%	-0.840	0.785	prostaglandin catabolic process
GO:0061476	response to anticoagulant	F7	0.000%	5.305	0.751	response to anticoagulant
GO:0001666	response to hypoxia	F7 THBS1	0.049%	4.221	0.729	response to anticoagulant
GO:1905217	response to astaxanthin	F7	0.000%	5.985	0.719	response to anticoagulant
GO:0051897	positive regulation of protein kinase B signaling	F7 THBS1	0.016%	1.526	0.581	response to anticoagulant
> GO:0000187	activation of MAPK activity	THBS1 PRDX2	0.024%	null	0.556	response to anticoagulant
GO:1904400	response to Thyroid stimulating hormone	F7	0.000%	5.055	0.715	response to anticoagulant
GO:1904612	response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxine	F7	0.000%	6.343	0.713	response to anticoagulant
GO:1905225	response to thyrotropin-releasing hormone	F7	0.000%	5.568	0.706	response to anticoagulant
GO:0033595	response to genistein	F7	0.000%	5.793	0.696	response to anticoagulant
GO:0010037	response to carbon dioxide	F7	0.002%	5.008	0.681	response to anticoagulant
GO:0010754	negative regulation of cGMP-mediated signaling	THBS1	0.000%	-0.645	0.550	response to anticoagulant
GO:0052651	monoacylglycerol catabolic process	Q9Z1Q2	0.000%	-0.377	0.769	response to anticoagulant
> GO:0006660	phosphatidylserine catabolic process	Q9Z1Q2	0.001%	null	0.762	response to anticoagulant

ANNEXE 4 : regroupement sémantique REVIGO (Plasma LM)

GO terms	Function	ID Gene Name	Enrichment in Dataset (%)	Enrichment in Genome Database (%)	P-Value adjusted	REVIGO GO regroupment
GO:0010951	negative regulation of endopeptidase activity	GAPDH	0.157%	6.235	0.537	blood coagulation and homeostasis
GO:0007599	hemostasis	GPI	0.049%	6.824	0.426	blood coagulation and homeostasis
> GO:0007596	blood coagulation	HBB	0.048%	null	0.300	blood coagulation and homeostasis
GO:0030308	negative regulation of cell growth	FHL1	0.030%	5.450	0.566	blood coagulation and homeostasis
GO:0002027	regulation of heart rate	MYH7	0.017%	5.837	0.496	blood coagulation and homeostasis
GO:0007568	aging	ENO3	0.088%	-1.049	0.803	aging
GO:0061621	canonical glycolysis	ENO3 GAPDHS GAPDH GPI PGAM1 PGAM2	0.001%	-1.587	0.728	canonical glycolysis
GO:0006094	gluconeogenesis	ENO3 GAPDHS GAPDH GPI PGAM1 PGAM2	0.262%	-2.174	0.722	canonical glycolysis
GO:0006096	glycolytic process	ENO3 GAPDHS GAPDH GPI PGAM1 PGAM2	0.545%	-1.132	0.706	canonical glycolysis
GO:0050832	defense response to fungus	GAPDH	0.028%	-1.809	0.594	acute-phase response
GO:0045087	innate immune response	CFH MASP2	0.148%	-2.285	0.610	acute-phase response

Annexe 5 : 107 candidats plasmatiques proposés à l'issue de mes travaux de thèse

ID Gene Name Plasma	QTL/SNP	Conventional secretion	UPS	Hypothetically secreted (VEs, Exosomes)	Protéines Ves (HPA, n=1998)	Protéines exosomales (Exocarta, n=100)
Approche *in-silico* (Publication 1)						
APOE		x			X	
ATP2A2	Shear force (Ch. 17)		x			
CDH13	SNP	x				
COL11A1	SNP		x			
CUBN	SNP	x				
EPHA7		x				
GAPDH			x		X	X
GLG1		x				
LGALS3BP		x				X
MPO		x			X	
PCDH7	SNP	x				
PRDX6			x			
TG	SNP	x				
ACTA1				x		
ACTB				x	X	
ACTC1	Tenderness score (Chr.10)			x		
ALB				x	X	
ATP5B				x		
BPGM				x		
CAPN2				x		
CASP8				x		
CCT8				x		
CENPF				x		
CKM				x		
COL13A1				x		
DES				x		
ENO3				x		
FASN	SNP			x	X	
FGF12	SNP			x		
FLNA				x	X	

GBP1				x		
HBB	Shear force (Ch.15)/SNP			x		
HSP90AA1	Shear force (Chr.21)/SNP			x	X	
HSPA1A				x	X	X
HSPA1B				x	X	
IGF1R				x	X	
LAMC1	Shear force (Chr.22)/SNP			x		
LDHA	Shear force (Ch.29)/SNP			x	X	X
LDHB	Shear force (Ch.5)/SNP			x	X	
LOX	SNP/SNP			x		
LRRC16A	SNP			x		
MYH2				x		
MYH3				x		
MYH7				x		
NID1				x		
PGAM2				x		
PGK1				x	X	
PPARG	Shear force (Chr.22)/SNP			x	X	
PRDX3				x		
PSMB2				x		
PVALB	Shear force (Chr.5)/SNP			x		
RGS2				x		
SDHB				x		
TPM1	Tenderness score (Chr.10)/SNP			x		
TPM3				x		
TUFM				x		
YWHAG				x	X	
Approche in-silico (Publi 1): 14						
CASP8AP2	Tenderness score (Chr.9)/SNP			x		
ACTN1	Tenderness score (Chr.10)			x		
CAT	Shear force (Chr.15)/SNP			x	X	
CCNB2	Tenderness score (Chr.10)/SNP			x		

CFL1	Tenderness score and Shear force			x		X
GSS	Shear force (Chr.13)/SNP			x		
MAPK1	Shear force (Chr.17)/SNP			x		
NEFL	Shear force (Chr.8)/SNP			x		
PRKACB	Shear force (Chr.3)/SNP			x		
PSMA7	Shear force (Chr.13)/SNP			x		
USP8	Tenderness score (Chr.10)/SNP			x		
YWHAB	Shear force (Chr.13)/SNP			x		X
YWHAZ	Shear force (Chr.14)/SNP			x		X
ZBTB21	Shear force (Chr.1)/SNP			x		
Approche in-silico (Publi 1): 4 plasma proteins from Picard and Gagaoua, 2019						
COL4A1		x				
HSPA5		x				X
ORM1		x			X	
PDIA3				x		
Approche expérimentale (Protéomique_21 PLASMA LM)						
MYH7				x		
TUBA4A				x		
ACTB				x		x
ENO3				x		
GAPDH				x	x	x
FHL1				x		
PLA2G2D5				x		
RNASE4				x		
AGT				x		
CFH		x			x	
F13B		x				
F9				x		
HRG				x		
LBP	Shear force (Chr.13)/SNP	x				
MASP2		x				
SERPIND1	Shear force (Chr.17)/SNP	x			x	

SERPINF2		x				
SERPING1		x				
SHBG		x				
GPX3	Shear force (Chr.7)/SNP	x				
ITIH3	Shear force (Chr.22)/SNP	x				
Approche expérimentale (Protéomique_11 PLASMA RA)						
ACTB				x		x
APOD		x				
C4BP				x		
CGN1	Tenderness score (Chr.28)/SNP	x				
F7		x				
G3MXB5				x		
GC		x				
LOC790886		x				
PRDX2				x		x
PROC				x		
THBS1	Tenderness score (Chr.10)/SNP			x		x
Approche in-silico (Protéomique _71 MUSCLE LM): 14 prédites secretees + plasma						
ACTA1				x		
ACTN2				x		
ALB		x				x
ENO3				x		
HBB	Shear force (Chr.15)/SNP			x		
HPX	Shear force (Chr.15)/SNP			x		
HSP90AA1	Shear force (Chr.21)/SNP			x		x
LDHB	Shear force (Chr.5)/SNP			x		x
MYH7				x		
NNT				x		
OGN	Shear force (Chr.8)/SNP	x				
PGAM2				x		
TPM3				x		
VCL				x		
Approche in-silico (Protéomique_9 MUSCLE RA): 3 prédites secretees + plasma						
HBB				x		
ATP2A2		x		x		
TPM1	Tenderness score (Chr.10)/SNP			x		

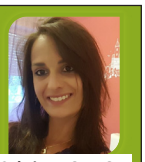
Annexe 6 : poster ISNH n° 476

INRA SCIENCE & IMPACT

September, 2-6, 2018

10th INTERNATIONAL SYMPOSIUM on the Nutrition of Herbivores

QUEST FOR PLASMA BIOMARKERS FOR BEEF TENDERNESS



Sabrina BOUDON

Sabrina BOUDON[1], Joëlle HENRY-BERGER[2], Isabelle CASSAR-MALEK[1]

[1] UNIVERSITÉ CLERMONT AUVERGNE, INRA, VetAgro SUP, UMR HERBIVORES, F-63122 SAINT-GENÈS-CHAMPANELLE, FRANCE

[2] UNIVERSITÉ CLERMONT AUVERGNE , GReD, UMR CNRS 6293 – Inserm U1103, F-63001 CLERMONT-FERRAND, FRANCE

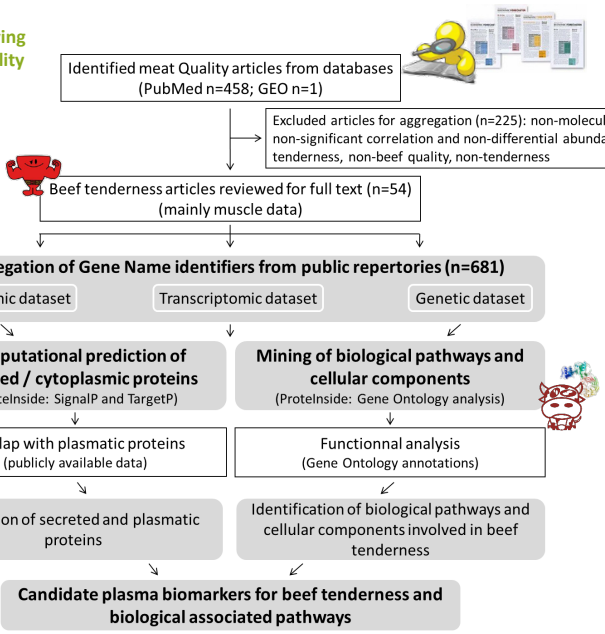
A challenge for the ruminant sector is to predict and manage the complex phenotypic traits related to meat quality before slaughtering and ageing, especially tenderness, a top priority for the beef industry.

Issue for the beef sector : Identification of low invasive biomarkers for application in tool kits at farm.

→ Objective: *In-silico* identification of plasma biomarkers for beef tenderness

APPROACH

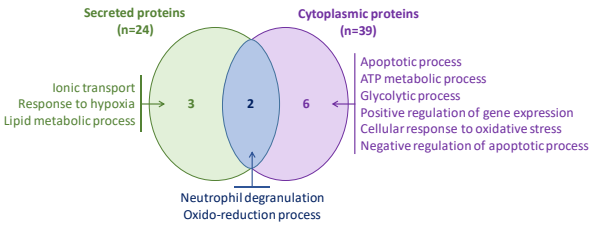
Scientific hypothesis:
Available published data may help identifying candidate plasma biomarkers for beef quality



RESULTS

Datasets	Nb. of unique GN	Secreted proteins + Plasmatic	Cytoplasmic proteins + Plasmatic
Proteomic (25 articles)	156	11	20
Transcriptomic (9 articles)	226	4	10
Genetic (20 articles)	328	9	13
General Bilan (Unique Gene Names)	710 (681)	24	39

Gene Ontology of plasmatic proteins



Some of the biological processes are consistent with tenderness mechanisms.

CONCLUSION

Meta-analysis and bioinformatic analysis of published data enabled to identify putative plasma biomarkers for beef tenderness. Thus, 63 proteins associated with 11 biological pathways were identified. Their detection in the plasma proteome of cattle from extreme groups of tenderness is on-going.

→ Biomarkers validation → Their integration in phenotyping tools in order to predict tenderness and screen animals at farm with blood sample

INRA SCIENCE & IMPACT

INRA Centre de Recherche Auvergne-Rhône-Alpes
Equipe Biomarqueurs
63122 Saint-Genès-Champanelle

☎ +33 (0) 4 73 62 41 96
sabrina.boudon@inra.fr
Site web: http://www.ara.inra.fr/

Projet co-financé par l'Union européenne

La Région Auvergne-Rhône-Alpes

Résumé

Le secteur de l'élevage bovin est en attente d'outils permettant de prédire et piloter les qualités sensorielles de la viande, notamment la tendreté qui est une priorité pour les consommateurs et pour la filière. La qualité de la viande est un phénotype complexe qui ne peut être évalué que tardivement après l'abattage des animaux et maturation de la viande. Depuis plus de 15 ans, des recherches ont permis d'identifier des marqueurs de la qualité de la viande utilisables sur échantillons musculaires prélevés par biopsie ou sur carcasse. Cependant, des travaux récents ont rapporté des relations parfois inverses entre l'abondance de certains biomarqueurs et la tendreté de la viande selon le muscle ou le type d'animal considéré. Ainsi, l'identification de biomarqueurs « génériques » et peu-invasifs s'impose comme un enjeu pour le secteur bovin.

Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse a été d'identifier de potentiels biomarqueurs plasmatiques pour prédire la tendreté de la viande bovine. Afin de répondre à cet objectif, mes travaux de thèse se sont articulés autour de deux approches: (i) une approche d'intégration de données moléculaires combinée à une analyse bio-informatique (approche *in-silico*) pour prédire le sécrétome plasmatique ; (ii) une approche expérimentale, basée sur la stratégie protéomique Shotgun LC MS/MS, pour identifier des candidats plasmatiques et des candidats musculaires (muscles *Longissimus* et *Rectus abdominis*) à partir de groupes de génisses IGP Fleur d'Aubrac contrastées pour la tendreté. Afin de caractériser ce phénotype complexe, les groupes extrêmes analysés ont été déterminés selon trois systèmes d'évaluation de la tendreté (Warner Brazler Shear Force, sensoriel et index synthétique combinant ces deux systèmes).

La combinaison de ces deux approches a permis de proposer pour la première fois une liste de 107 protéines plasmatiques candidates pour évaluer la tendreté de la viande bovine, parmi lesquelles 32 sont retrouvées dans des QTL de tendreté. Cette stratégie a également permis de compléter la liste de candidats musculaires déjà connus. Les données agrégées dans la littérature sont majoritairement associées à des bovins mâles (taurillons et bouvillons), ainsi ces travaux permettent de proposer pour la première fois une liste de candidats musculaires et plasmatiques pour la tendreté de génisses. Ces travaux de thèse ont également permis de compléter les connaissances sur le déterminisme de la tendreté, notamment *via* l'implication des voies de sécrétion vésiculaires (micro-vésiculaire et macro-vésiculaire (exosome)) et les cils primairesces résultats pourraient permettre de proposer des outils de phénotypage pour prédire « le potentiel tendreté » du vivant de l'animal, mais aussi de valoriser des filières de qualité, d'orienter/segmenter les marchés et de proposer des conduites d'élevage adaptées au potentiel des animaux.

Mots clés : Agrégation et intégration de données, Shotgun LC-MS/MS, protéomique, sécrétome, biomarqueurs plasmatiques, tendreté de la viande bovine

Abstract

A challenge for the ruminant sector is to predict and manage the phenotypic traits related to meat production and quality especially tenderness, a priority of the beef industry. Meat quality is a complex phenotype that can be evaluated only after slaughtering and meat ageing. Previous research efforts have investigated the potential of muscle-derived markers to assess meat quality from biopsy or on carcass samples. However, recent studies have reported relationship sometimes inverse between protein abundance and tenderness depending on the muscle type or animal considered. Thus, the identification of "generic" and low-invasive biomarkers is an issue for the beef sector.

In this context, the objective of my PhD thesis was to discover plasma candidate biomarkers to predict and manage beef tenderness. To meet this objective, my research included two complementary approaches: (i) a molecular data aggregation from publicly available data combined with bioinformatics (*in silico* approach) to reconstruct the secretome associated with tenderness; (ii) a proteomic analysis (Shotgun LC-MS/MS) to identify plasma and muscle candidates (*Longissimus* et *Rectus abdominis muscles*) from contrasted tenderness groups of PGI Fleur d'Aubrac heifers. Extreme groups of tenderness were established based on three evaluation methods: Warner Bratzler Shear Force, sensory analysis, and according to a synthetic index which combines the previous two evaluation systems.

Thanks to the combination of the two approaches, I can propose for the first time an atlas of 107 plasma candidate proteins to assess the tenderness in cattle, of which 32 are included in tenderness QTL. I could also complete the list of muscle candidates reported in the scientific literature. While published data report mainly data on male bovines (steers, bull calves), my PhD work allows to propose for the first time a list of plasma and novel muscle candidates for heifer tenderness. My results also contribute to improve knowledge on tenderness determinism, notably through the involvement of extracellular vesicles (micro-vesicular (EVs), macro-vesicular (exosomes)), and the primary cilia. This knowledge will help to design phenotypic tools for "tenderness potential" prediction, in living animal and to add value to high-quality beef sector.

Keywords: Data aggregation and integration, Shotgun LC-MS/MS, proteomics, secretome, plasma biomarkers, beef tenderness