

Recherche de marqueurs de tendreté dans la viande de porc par analyse protéomique

Martine MORZEL (1), Claire BOUCHUT (1), Christophe CHAMBON (1), Elisabeth LAVILLE (1),
Karen O'REILLY (2), Anne Maria MULLEN (2)

(1) INRA, Station de Recherche sur la Viande, Centre de Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle, France
(2) Teagasc, National Food Centre, Dunsinea, Dublin 15, Irlande

Recherche de marqueurs de tendreté dans la viande de porc par analyse protéomique

Dans un lot de 37 porcs abattus le même jour, 2 échantillons (dits « dur » et « tendre ») ont été sélectionnés selon le critère de résistance mécanique de la viande cuite après 7 jours de maturation. Ces échantillons ne différaient substantiellement ni par leur pH ultime ni par leur longueur de sarcomère. La fraction protéique soluble au TCA des échantillons a été analysée par électrophorèse bi-dimensionnelle à 1 et 7 jours de maturation, et les spots différentiellement exprimés ont été analysés par MALDI-TOF. La comparaison des profils protéiques obtenus a permis de définir 21 spots d'intérêt, c'est à dire des potentiels marqueurs de tendreté. Ces spots correspondent à des protéines ou fragments protéiques ayant un poids moléculaire de 18,5 à 37,5 kDa. Un polypeptide d'environ 31 kDa est décrit plus particulièrement : il s'agirait d'un fragment de titine, situé intégralement dans la zone de la molécule traversant la strie Z du muscle. La déduction de sa séquence à partir de l'empreinte peptidique MALDI-TOF permet d'envisager, après validation de ces résultats préliminaires, le développement d'un test de diagnostic rapide basé sur une détection immunologique.

Identification of biomarkers of tenderness in pig meat by proteomic analysis

Within a batch of 37 pigs slaughtered on the same day, 2 samples (so-called "tough" and "tender") were selected based on the mechanical resistance of cooked meat after 7 days of ageing. Those samples did not differ substantially as regards ultimate pH and sarcomere length. Their TCA-soluble protein fraction was analysed by two-dimensional electrophoresis at 1 and 7 days of ageing, and the differentially expressed spots were analysed by MALDI-TOF mass spectrometry. Comparison of protein patterns allowed to define 21 spots of interest, i.e. potential markers of tenderness. Such spots correspond to proteins or protein fragments with molecular weight ranging from 18.5 to 37.5 kDa. One polypeptide with a molecular weight of approximately 31 kDa is described in more details. It is tentatively identified as a titin fragment, located integrally in the specific zone of titin spanning across the muscle Z-line. Elucidation of its sequence from the MALDI-TOF peptide mass fingerprinting allows to consider the development of an immuno-based diagnostic kit, after the necessary validation of such preliminary results.

INTRODUCTION

La relation entre protéolyse *post-mortem* des protéines musculaires et texture finale de la viande est largement documentée (OUALI, 1990 ; KOOHMARAIE, 1992). La protéolyse dans la viande de porc a été étudiée essentiellement par électrophorèse monodimensionnelle (BOLES et al, 1992 ; KITAMURA et al, 2004) ou bidimensionnelle (LAMETSCH et al, 2003 ; MORZEL et al, 2004). Toutefois, la plupart des études réalisées se rattachaient aux protéines totales, dont l'extraction est relativement longue et onéreuse et par conséquent peu adaptée au développement de kits de diagnostic rapide. Une alternative possible, décrite par STOEVA et al (2000) est d'utiliser une extraction au TCA (acide trichloroacétique) qui présente l'avantage d'être rapide et peu onéreuse et qui pourrait donc être utilisée en routine, dans le laboratoire de contrôle d'un abattoir par exemple. Ainsi, l'étude présentée a pour objectif de rechercher dans la viande de porc des marqueurs de tendreté parmi les protéines et fragments protéiques solubles au TCA. L'analyse protéomique par électrophorèse bi-dimensionnelle est la méthode choisie pour mener à bien cette étude préliminaire.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1. Animaux et prélèvements

37 porcs (Landrace x Large White) ont été abattus le même jour, à un poids moyen de 110 kg, dans un abattoir commercial. Les carcasses ont été découpées, le muscle *Longissimus dorsi* prélevé et découpé en tranches de 1 pouce (2,54 cm) d'épaisseur. Les tranches ont été mises sous vide et entreposées à 4°C.

1.2. pH, longueur de sarcomère et mesures mécaniques de texture

Le pH ultime est mesuré dans la tranche correspondant au niveau de la dernière côte à l'aide d'un pH mètre portable (Orion, Boston, USA) équipé d'une sonde pénétrante (Amagross, Murrisk-Westport, Irlande). La longueur de sarcomère est mesurée à 24 h *post-mortem* selon la méthode de CROSS et al (1980). La force de cisaillement est mesurée sur échantillons cuits à 75°C à cœur à 1 jour et 7 jours *post-mortem*, puis refroidis à 4°C jusqu'au lendemain. Les échantillons sont détaillés en cylindres de 1,25 cm de diamètre, puis cisailés grâce à un lame de Warner-Bratzler sur un Instron modèle 5543 (Instron Ltd, Buckinghamshire, Royaume-Uni).

1.3. Analyse du protéome

1.3.1. Extraction des protéines solubles au TCA

Un échantillon de muscle est broyé dans de l'eau (1:2 p/v) sur de la glace à l'aide d'un polytron. Du TCA (acide trichloroacé-

tique) est ajouté afin d'atteindre une concentration finale de 5 %, et le surnageant est collecté après centrifugation à 4°C (2000g, 30 min). La concentration protéique des extraits est mesurée par la méthode de Biuret. Les extraits sont préparés à partir d'échantillons prélevés à 1 jour et 7 jours *post-mortem*.

1.3.2. Conditions d'électrophorèse

La focalisation isoélectrique (IEF) est effectuée sur des bandelettes de 17 cm, avec un gradient de pH immobilisé 3-10 NL, chargées à 90 µg par bandelette. Cette charge protéique est appliquée par inclusion d'un volume adéquat d'extrait dans un tampon de réhydratation, constitué de 7M urée, 2M thiourée, 2 % CHAPS, 5mM Pefabloc et 0,2 % d'ampholytes. Le voltage final (10000 V) de la migration IEF est maintenu jusqu'à 60000 Vh. Les bandelettes sont ensuite transférées sur un gel d'acrylamide à 12 %. La migration a lieu à 15 mA. Les gels sont colorés au nitrate d'argent suivant le protocole de YAN et al (2000). Les gels sont produits en triplicat pour chaque échantillon.

1.3.3. Analyse d'image

Les gels sont analysés par le logiciel PDQuest (Biorad). Les quantités correspondant aux spots sont normalisées et exprimées en ppm. On définit les spots d'intérêt comme ceux présents uniquement dans l'échantillon «tendre» ou ceux dont la quantité est trois fois supérieure dans ce même échantillon au jour 7.

1.3.4. Identification des protéines par spectrométrie de masse

Les spots sont excisés du gel, décolorés, digérés et dessalés grâce à un kit Digest ₉₆ ZP (Millipore). Le mélange résultant de peptides est déposé sur la plaque MALDI, puis la matrice (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) est ajoutée. Les masses monoisotopiques des peptides sont mesurées par MALDI-TOF (PerSeptive Biosystems). Les empreintes peptidiques sont utilisées pour identifier les protéines ou fragments protéiques, par interrogation de la banque de données NCBIInr à l'aide du logiciel « Profound » (www://prowl.rockefeller.edu).

2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2.1. Sélection de deux échantillons pour analyse protéomique

On observe une baisse de la résistance mécanique de la viande (n=37) du jour 1 (48,8 N +/- 11,98) au jour 7 (31,34 N +/- 8,42). Deux échantillons sont sélectionnés pour leur résistance mécanique forte (D « dur ») ou faible (T « tendre ») aux deux jours de mesure, tout en s'assurant que ni leur pHu ni leur longueur de sarcomère ne diffèrent substantiellement (tableau 1).

Tableau 1 - Caractéristiques des échantillons sélectionnés

	pHu	WB jour 1 (N)	WB jour 7 (N)	longueur de sarcomère (µm)
T (tendre)	5,49	32,97	27,85	1,60
D (dur)	5,47	57,94	42,86	1,66

2.2. Profil protéique de deux échantillons prélevés à J7 représentatifs

D'un point de vue technique, les profils d'électrophorèse obtenus sont satisfaisants. Environ 160 spots sont détectés et appariés sur les gels d'électrophorèse. Le gel synthétique obtenu après traitement par PDQuest de l'ensemble des gels produits est présenté en figure 1. 21 spots sont retenus comme des spots d'intérêt selon la règle de décision décrite précédemment. Les spots spécifiques à l'échantillon T sont marqués en trait plein, alors que ceux dont la quantité est trois fois supérieure dans cette même classe sont marqués en pointillés. Ces spots correspondent à des protéines ou fragments ayant des poids moléculaires s'échelonnant de 18,5 à 37,5 kDa.

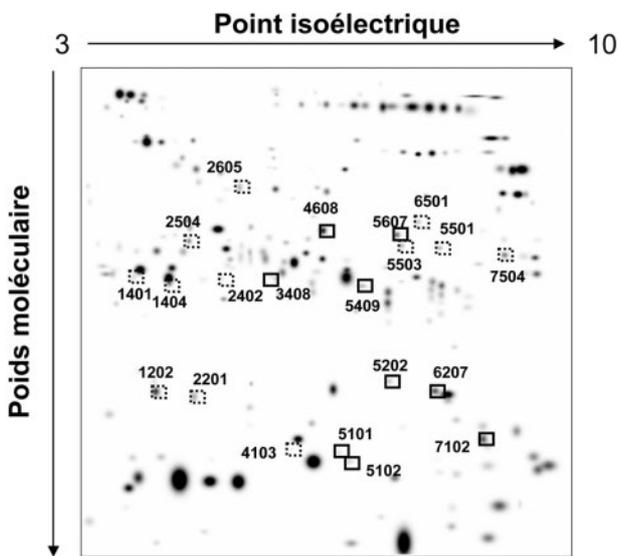


Figure 1 - Profils protéiques de 2 échantillons

2.3. Identification des spots d'intérêt

Dans notre étude, outre le fait que la charge protéique est faible, une des difficultés inhérentes à l'identification des spots est qu'il s'agit en grande partie de fragments polypeptidiques et non de protéines entières. Les scores d'identification étant basés notamment sur le taux de recouvrement de la protéine « parente », ils sont naturellement plus faibles dans le cas de fragments. D'autres critères, par exemple la contiguïté des peptides détectés, peuvent dans ce cas aider à l'identification des spots. Ainsi, bien que le score dit « de succès » est de 1,65 sur le logiciel ProFound, le tableau 2 fournit les informations sur les 5 spots pour lesquels un score supérieur à 0,4 est obtenu.

Parmi les premières propositions, seule la chaîne lourde de myosine -MHC- a déjà été décrite comme étant affectée par la maturation. Ainsi, LAMETSCH et al (2003) ont montré que l'intensité d'un spot correspondant à un fragment de MHC était corrélée à la texture de viande de porc mesurée par WB. En revanche, à notre connaissance, il n'a jamais été démontré la protéolyse de l'aldéhyde déhydrogénase ou de la trabeculine au cours de la maturation. La trabeculine a été décrite relativement récemment (SUN et al, 1999). Il s'agit d'une protéine géante (614 kDa) se caractérisant dans son extrémité N-terminale par une forte homologie avec la protéine α -actinine, la protéine majeure de la strie Z, liant les filaments d'actine du muscle. (AHN et al, 2003). Elle présente également un domaine dit « spectrin-like » capable de lier les protéines du cytosquelette. Elle contribuerait donc à maintenir l'architecture de la cellule musculaire, et aussi bien sa dégradation *post-mortem* que la corrélation de sa dégradation avec la texture finale de la viande semble plausible. D'autres protéines de la famille des « actin binding proteins », comme la cofilin ou la capZ, ont été récemment identifiées comme des substrats de protéolyse (LAMETSCH et al, 2003). Toutefois, l'homologie forte de la trabeculine avec d'autres protéines présentes dans le muscle, notamment l' α -actinine, rend son identification incertaine. En revanche, la deuxième proposition du spot 7504 nous semble particulièrement intéressante pour plusieurs raisons: en premier lieu, la titine, une protéine du cytosquelette, a été décrite par plusieurs auteurs comme étant affectée par la protéolyse *post-mortem* et contribuant largement aux phénomènes de maturation (LOCKER et WILD, 1984 ; BOLES et al, 1992 ; LAMETSCH et al, 2003). De surcroît, les résidus peptidiques détectés après analyse par MALDI-TOF sont situés dans une zone très spécifique de la séquence protéique (tableau 3).

Ainsi, à l'exception des peptides 2 et 7, les autres couvrent une zone restreinte allant du résidu 1389 à 1653 du fragment de titine identifié. La zone recouverte aurait pour séquence:

1389 rleetdesqlerlykpvfvlkptsfkcklegqsarfllkvvgrpm-
petfwfhngqavvndytkkvikedgtqslivpatpsdsgewtvvaqnrags-
tisviltveavehqkpvfveklknvkvkegarlemkvratgnpnpdivwlkns-
diivphkypkiiiegtkgqaalkidstvsqdsawytatainkagrdtrckvnvevf
aepeperrliiprgtyrakeiaapalephlrygqeewegdlydkekqkqkpfk
1653

Un logiciel de calcul des poids moléculaire et point isoélectrique nous fournit les valeurs théoriques suivantes : 30,1 kDa / 7,87. Ce poids moléculaire diffère peu de celui calculé à l'aide de marqueurs inclus dans le gel (31 kDa) et

Tableau 2 - Résultats des interrogations par le logiciel ProFound

Spot	Score	Identification 1	Identification 2
1401	0,42	trabeculin	/
3408	0,41	aldéhyde dehydrogenase	/
5501	1,47	trabeculin	titine
6207	0,54	myosin heavy chain (MHC)	/
7504	1,29	trabeculin	titine (fragment N-terminal)

Tableau 3 - Données relatives aux résidus peptidiques reconnus sur le fragment de titine

Peptide	Masse	Résidus	Séquence
1	610,416	1607-1611	LIIPR
2	960,560	497-504	TREIITTK
3	1178,644	1645-1653	EKQQKPFK
4	1423,745	1526-1538	ATGNPNPDIVWLK
5	1503,716	1389-1400	RLEETDESQLER
6	1642,783	1592-1605	VNVEVEFAEPEPER
7	1648,878	1859-1873	VTAENPEGVIEHKVK
8	1665,985	1404-1414	LYKPVFVLKPTSFX
9	1798,884	1592-1606	VNVEVEFAEPEPERR

le point isoélectrique apparent du spot est également en adéquation avec la valeur théorique. Enfin, en se fondant sur les observations de GREGORIO et al (1998), il est possible de définir la position de ce fragment dans l'ultrastructure même du muscle. Ainsi, ce fragment d'environ 30 kDa fait partie intégrante de la portion de la molécule de titine traversant la strie Z. L'apparition de ce fragment *post-mortem*, mais aussi sa corrélation avec une résistance mécanique moindre, est donc en accord avec de nombreuses observations ultrastructurales qui démontrent une dégradation autour de la strie Z (FUKAZAWA et YASUI, 1968, MESTRE PRADES et al, 2002), ainsi que notre observation récente (MORZEL et al, 2004) que des protéines constitutives de la strie Z peuvent être dégradées.

CONCLUSION

Bien que l'étude ait été menée sur seulement deux animaux, l'intérêt de l'analyse protéomique pour identifier des potentiels marqueurs de tendreté est clairement démontrée. Ces résultats préliminaires doivent être confirmés sur un plus grand nombre d'animaux, et l'élaboration d'un test de diagnostic basé sur une détection immunologique est envisagée.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été réalisée en partie grâce au soutien financier de Teagasc par l'intermédiaire du programme « Teagasc Biotechnology Initiative ».

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AHN D-H., SHIMADA K., TAKAHASHI K., 2003. J. Food Sci. 68, 94-98.
- BOLES J.A., PARRISH JR F.C., HUIATT T.W., ROBSON R.M. 1992. J. Anim. Sci. 70, 454-464.
- CROSS, H.R., WEST R.L., DUSTON T.R., 1980. Meat Sci., 5, 261-266.
- GREGORIO C.C., TROMBITAS K., CENTNER T., KOLMERER B., STIER G., KUNKE K., SUZUKI K., OBERMAYR F., HERRMANN B., GRANZIER H., SORIMACHI H., LABEIT S, 1998. J. Cell Biol., 43, 1013-1027.
- FUKAZAWA T., YASUI T., 1968. Biochem. Biophys. Acta, 140, 534.
- KITAMURA S., MUROYA S., TANABE S., OKUMURA T., CHIKUNI K., NISHIMURA T., 2004. Proceedings 50th ICoMST, 8-13 Aout 2004, Helsinki, Finlande.
- KOOHMARAIE M., 1992. Biochimie, 74, 239-245.
- LAMETSCH R., KARLSSON A., ROSEVOLD K., ANDERSEN H.J., ROEPSTORFF P., BENDIXEN, E. 2003. J. Agric. Food Chem., 51, 6992-6997.
- LOCKER R.H., WILD, D.J.C., 1984. Meat Sci., 11, 89-108.
- MESTRE PRADES J.A., GARCIA E COSTA F.J.S., RIBEIRO A.M.R., DIAS CORREIA A.D., 2002. Meat Sci., 61, 103-113.
- MORZEL M., CHAMBON C., HAMELIN M., SANTÉ-LHOUTELLIER V., SAYD T., MONIN G, 2004. Meat Sci., 67, 689-696.
- OUALI A., 1990. J. Muscle Foods, 1, 129-165.
- STOEVA S., BYRNE C.E., MULLEN A.M., TROY D.J., VOELTER W, 2000. Food Chem., 69, 365-370.
- SUN Y., ZHANG J., KRAEFT S-T., AUCLAIR D., CHANG M-S., LIU C., SUTHERLAND R., SALGIA R., GRIFFIN J.D., FERLAND L.H., CHEN L.B., 1999. J. Biol. Chem., 274, 33522-33530.
- YAN J.X., WAIT R., BERKELMAN T., HARRY A., WESTBROOK J.A., WHEELER C.H., DUNN M.J., 2000. Electrophoresis, 21, 3666-3671.