

Etude d'un critère de qualité de la viande, la tendreté, par l'analyse du transcriptome du muscle porcine (*Longissimus dorsi*)

Valérie LOBJOIS (1), Laurence LIAUBET (1), Magali SANCRISTOBAL (1), Pascale LE ROY (2),
Pierre CHEREL (3), François HATEY (1)

(1) INRA, Département de Génétique Animale, Génétique Cellulaire, BP52627, 31326 Castanet-Tolosan Cedex

(2) UMR INRA / AgroCampus Rennes, Génétique Animale, 65 rue de Saint-Brieuc, 35042 Rennes Cedex,

(3) France Hybrides, 100, Avenue Denis Papin F, 45 808 St Jean de Braye Cedex

liaubet@toulouse.inra.fr

Etude d'un critère de qualité de la viande, la tendreté, par l'analyse du transcriptome d'un muscle porcine (*Longissimus dorsi*)

L'objectif de ce projet est de caractériser la variabilité de l'expression des gènes en relation avec la qualité de la viande à travers l'analyse de transcriptome du muscle strié squelettique.

Les échantillons de muscle du *Longissimus dorsi* provenant d'environ mille animaux F2 obtenus par croisement de 2 lignées males d'origines différentes (France Hybrides) ont été prélevés. La tendreté de ces échantillons a été estimée à partir de la mesure de la force de cisaillement par la méthode Warner-Bratzler (WBSF) après cuisson.

Nous avons sélectionné 30 échantillons présentant des valeurs extrêmes, hautes et basses, de WBSF. Les ARN isolés à partir de ces échantillons ont été hybridés sur des micro-réseaux Nylon comportant 3456 produits PCR obtenus par amplification d'ADNc porcins.

En appliquant un modèle de régression linéaire aux données d'expression obtenues, nous avons identifié 151 clones dont l'expression est significativement corrélée avec les forces de cisaillement (taux de faux positifs < 0,05). Parmi ces clones, les plus importants pour la force de cisaillement ont été sélectionnés par la méthode statistique des forêts aléatoires. L'analyse de l'expression de quelques gènes significatifs par RT-PCR en temps réel donne les mêmes résultats que l'analyse en micro-réseaux. Les principales fonctions impliquées sont la régulation de l'appareil contractile et le métabolisme. Nous avons également identifié des gènes impliqués dans la signalisation et la régulation transcriptionnelle. Ces résultats préliminaires semblent confirmer l'intérêt de l'analyse du transcriptome pour l'identification de gènes dont l'expression varie avec un critère de qualité de la viande. Des études complémentaires de nos données en micro-réseaux sont nécessaires pour définir des marqueurs de la tendreté.

A study of a meat quality trait, tenderness, by the transcriptome analysis in the pig *Longissimus dorsi* muscle

The aim of our project was to characterize variability of gene expression in relation to meat quality traits through the transcriptome analysis of the skeletal striated muscle.

F2 pigs were obtained by crossing two different male lines (France Hybrides). The muscle samples from *Longissimus dorsi* were taken from about thousand animals and characterized by shear force (Warner-Bratzler method, WBSF) as tenderness measure.

We selected 30 samples displaying, after cooking, extreme WB values (high and low). RNA isolated from these samples were hybridized on Nylon microarrays spotted with 3456 PCR products obtained by amplification of pig cDNA.

Using a linear regression model, we sorted out 151 cDNA clones showing an expression significantly correlated with shear force variation (False Discovery Rate < 0.05). We used a powerful statistical method, the random forests, to select the most important of these clones for shear force. The expression of four significant genes by another approach, real-time RT-PCR, gave the same results as microarrays. Main functions represented are contractile apparatus regulation and metabolism. We also found genes for signal transduction and transcriptional regulation. These preliminary results allowed us to consider transcriptome analysis to identify variation in genes expression correlated with a meat quality trait. Further analysis of our microarray data are needed to define a combination of biomarkers for meat tenderness.

INTRODUCTION

Les qualités des viandes de porc dépendent des caractéristiques physico-chimiques de celles-ci (Lebret, 2004), caractéristiques elles-mêmes sous l'influence de nombreux facteurs environnementaux (Monin, 2003) et génétiques (Renand et al., 2003). Parmi les qualités sensorielles, la tendreté apparaît comme un critère important du point de vue des consommateurs (Maltin et al., 2003). Les études réalisées chez le porc montrent que différentes caractéristiques histologiques (type des fibres, longueur des sarcomères) et biochimiques (contenu et type de collagène, protéolyse) peuvent contribuer à la variabilité de la tendreté de la viande de porc (Wheeler et al., 2000). Cependant, les mécanismes moléculaires responsables restent à identifier.

Dans ce contexte, l'objectif de ce projet est de mettre en relation le profil d'expression des gènes musculaires avec les caractéristiques physico-chimiques du muscle et la qualité des viandes. Cette étude consiste en une première étape dans l'identification de marqueurs moléculaires de la tendreté de la viande (muscle *Longissimus dorsi*) par l'étude du transcriptome.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1. Animaux, prélèvements et mesures de texture

Les porcs utilisés sont des animaux F2, c'est-à-dire obtenus à l'issue d'une deuxième génération de croisement, produits à partir de deux lignées mâles commercialement utilisées pour la production de verrats terminaux (lignée FH016, de type Piértrain, et lignée FH019, lignée synthétique issue de fondateurs Large White, Duroc et Hampshire, France Hybrides). Les animaux ont été génotypés pour les mutations RN⁺ du gène RN (Milan et al., 2000) et n du gène HAL (Fujii et al., 1991), ces deux gènes ayant un effet majeur connu sur la tendreté de la viande de porc (Monin et al., 1999; Le Roy et al., 2000). Des échantillons de muscle *Longissimus dorsi* ont été prélevés peri-mortem sur 1000 animaux répartis en 12 familles. Ces échantillons subissent une cuisson de 30 min (chaleur sèche, au four) à 240°C. Dix carottes cylindriques d'1 cm de diamètre ont été découpées dans chaque échantillon et laissées refroidir à température ambiante. La force de cisaillement (WBSF) a été estimée par la force maximale à la rupture avec une lame de Warner-Bratzler (Shackelford et al., 2004). La valeur retenue pour chaque échantillon est la moyenne des 10 mesures obtenues en excluant les valeurs divergeant de plus de deux écart-types. Les valeurs de WBSF obtenues varient entre 22,68 et 55,47 Newtons.

L'étude préliminaire d'expression des gènes présentée ici concerne un sous-échantillon d'une trentaine d'animaux sélectionnés, à l'intérieur de ce dispositif très large. Les animaux utilisés dans cette étude sont ceux ayant les valeurs les plus hautes et les plus basses de force de cisaillement dans les différentes familles, soit au total 15 animaux ayant des valeurs extrêmes basses et 15 des valeurs extrêmes hautes (différentiel de l'ordre de 3 écart-types phénotypiques du caractère).

1.2. Obtention des ARN

Après broyage des échantillons dans l'azote liquide, les ARN totaux ont été extraits à l'aide d'un kit commercial (RNeasy Fibrous Tissue Midi kit, Qiagen France SA). Les ARN ont été élués dans 300 µl d'eau RNase-free, contrôlés à l'aide du Bioanalyzer Agilent (Agilent Technologies France) et conservés à - 80°C.

1.3. Hybridation des réseaux d'ADNc

1.3.1. Réseaux d'ADNc

Les protocoles d'amplification, de dépôt et de traitement des membranes ont été adaptés de ceux du laboratoire TAGC (TAGC INSERM-ERM, 206 Parc Scientifique de Luminy, 13288 Marseille cedex 09, France) et sont disponibles sur le site Web de ce laboratoire (http://tagc.univ-mrs.fr/oncogenomics/Nylon_microarrays.php).

Les produits d'amplification PCR issus de 3456 clones d'ADNc ont été déposés à haute densité sur des membranes de nylon de petit format (18x72 mm ; Immobilon Ny+, Millipore, USA). Ces 3 456 clones correspondent à 1 908 gènes annotés.

Les clones provenaient de deux banques normalisées distinctes : 1 056 clones sont issus d'une banque multi-tissus construite dans le cadre du projet Agenae (www.inra.fr/agenae), 2 208 clones sont issus d'une banque de muscle construite par C. Bendixen (Département d'Élevage et de Génétique Animales, Institut Danois des Sciences de l'Agriculture, centre de recherches de Foulum, Tjele, Danemark), 192 clones constituent des contrôles appropriés.

L'amplification a été réalisée par PCR en plaques de 96 puits, dans un volume de 100 µl en utilisant des amorces M13 universelles avec 40 cycles (30 sec à 94°C ; 40 sec à 60°C ; 2 min à 72°C).

Les dépôts ont été effectués en double par un robot Microgrid II (Genomic Solutions, UK). Ils ont un diamètre de 100 µm et sont séparés de 300 µm. Après dépôt, les produits PCR ont été dénaturés en milieu alcalin et fixés par pontage aux ultraviolets.

1.3.2. Hybridation des réseaux

La qualité des membranes a été vérifiée par hybridation avec un oligonucléotide (hybridation vecteur) correspondant à une partie de la séquence du vecteur présente dans les produits d'amplification. L'oligonucléotide a été marqué au ATP^γ³³P puis hybridé pendant 12 heures à 42°C. Après lavage, la membrane a été placée contre un écran sensible pendant 2 heures puis celui-ci a été analysé avec un système d'acquisition d'image avec une résolution de 25 µm (FUJIFILM BAS-5000, Fujifilm, Raytest France).

Après déshybridation, les réseaux ont été hybridés avec les ADNc radioactifs synthétisés à partir des ARN par une

transcriptase inverse (SuperScript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase, Invitrogen, France) en présence de dCTP α ³²P (activité spécifique > 3 TBq.mmol⁻¹, Perkin Elmer, France). L'hybridation est réalisée pendant 24 heures à 68°C. Après lavage, les images ont été obtenues comme ci-dessus.

Les images des hybridations ont été quantifiées par la mesure de l'intensité de chaque spot à l'aide d'un logiciel semi-automatique (BZScan) (Lopez et al., 2004).

1.4. Traitement des données

1.4.1. Normalisation des données

Pour chaque spot, les données issues de BZScan ont été normalisées par la médiane des intensités de chaque membrane pour permettre la comparaison entre les membranes. Afin d'éliminer des possibles variations de dépôts sur les membranes, les valeurs précédemment centrées ont été divisées par l'intensité obtenue après l'hybridation vecteur. Enfin, les données étant issues de 3 expériences d'hybridation différentes, nous avons centré les intensités de chaque clone autour de la médiane de chaque expérience d'hybridation. Les données ainsi obtenues ont été ensuite transformées en logarithmes. Seuls les clones (2 489 clones) ayant un signal supérieur à 3 fois la médiane des blancs après hybridation vecteur dans 80 % des membranes utilisées ont été conservés.

1.4.2. Analyses statistiques

Afin d'identifier des variations d'expression de gènes associées à la force de cisaillement, deux types d'analyses statistiques ont été menées : par classification et par régression en fonction de la force de cisaillement.

Les clones différenciellement exprimés entre les deux classes d'échantillons utilisés ont été identifiés à l'aide d'un test de Student. Les p-values ainsi obtenues ont été corrigées pour la multiplicité des tests et le taux de faux positifs estimé (False Discovery Rate, FDR) (Benjamini et al., 2001). Nous avons pour cela utilisé le package « multtest » disponible dans le logiciel d'analyse R version 2.1.1 (www.r-project.org/). Pour validation, une classification ascendante hiérarchique des clones sélectionnés (FDR<0,2) et des échantillons a été menée à l'aide des fonctions hclust et heatmap.

La recherche de gènes dont l'expression est corrélée avec la force de cisaillement a ensuite été menée en appliquant un modèle de régression linéaire simple à l'aide du logiciel d'analyse R. Nous avons utilisé la fonction lm avec comme variable à expliquer la force de cisaillement et l'expression d'un gène comme variable explicative. Afin de sélectionner les clones significatifs et évaluer le taux de faux-positifs, nous avons utilisé le package « multtest » pour calculer les p-values ajustées des pentes des droites de régression obtenues pour chaque clone. Nous avons sélectionné les clones ayant un FDR < 0,05. Une autre approche statistique, les forêts aléatoires ou Random Forest, (package randomForest dans R) (Breiman, 2001), nous a permis de classer ces clones en fonction de critères d'importance.

L'analyse de ces clones selon le Gene Ontology a été menée avec le logiciel FatiGO (<http://www.fatigo.org/>).

1.5. RT-PCR en temps réel

1.5.1. Rétro-transcription (RT)

La synthèse des ADNc est réalisée à partir de 2µg d'ARN. Les ARN sont retro-transcrits 1h à 37°C en présence d'oligo(dT)₁₅ (Roche Diagnostics), de la reverse transcriptase SuperscriptII (Life Technologies) et de dCTP α ³²P comme traceur radioactif, permettant d'évaluer la quantité d'ADNc obtenue. Après hydrolyse des ARN, les produits de la reverse transcription sont purifiés sur colonne G50 puis repris dans de l'eau à raison de 2ng/µl. L'absence de contamination génomique de chaque produit a été contrôlée par PCR.

1.5.2. PCR en temps réel

Pour chaque gène testé en PCR en temps réel, les amorces sont choisies pour être localisées de part et d'autre d'un intron. En l'absence de données spécifiques, l'organisation exon - intron des gènes a été déduite de celle connue sur le génome humain grâce au logiciel Iccare (<http://genopole.toulouse.inra.fr/bioinfo/Iccare/>, Muller et al., 2004). Les amorces ont été choisies avec le logiciel Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Pour la PCR en temps réel, nous avons utilisé un thermocycleur ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems) pour la mesure de la fluorescence produite par l'incorporation de SYBRGreen au cours de l'amplification. Les réactions de PCR sont préparées en plaque 384 puits avec un robot pipetteur (TECAN genesis rsp 200X8). Ces réactions sont réalisées dans un volume final de 13µl à l'aide d'un kit commercial (SYBR Green PCR Core Reagent, Applied Biosystems), chaque point PCR étant préparé en double. Les conditions d'amplification sont : 50°C 2min, 95°C 10min, 40 cycles (95°C 15s, 60°C 1min).

Pour chaque couple d'amorces utilisé, l'efficacité de PCR a été déterminée avec une gamme de dilutions de l'échantillon calibrateur (ici, un mélange des ADNc des différents échantillons). D'autre part, la spécificité de chaque PCR a été vérifiée en effectuant une courbe de fusion (ou courbe de dissociation) de l'amplicon.

1.5.3. Analyses des données de PCR en temps réel

L'analyse des résultats a été en partie réalisée à l'aide du logiciel SDS (Sequence Detection System, Applied Biosystems) couplé au thermocycleur. Pour un gène donné, le C_T (threshold cycle) moyen par duplicat est calculé et la quantité relative d'ARNm de chaque gène évalué par la méthode du 2^{- $\Delta\Delta$ C_T} (Livak et Schmittgen, 2001). Brièvement, les données de chaque échantillon sont normalisées par rapport à un gène de référence (Δ C_T) puis chaque Δ C_T comparé à celui de l'échantillon calibrateur ($\Delta\Delta$ C_T). Deux gènes de référence ont été utilisés : un inhibiteur de phosphatase choisi à partir des données transcriptome, PPP1R1B (Dopamine- and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein,

numéro d'accèsion Swissprot : Q29277) et E2-CDC34 (Ubiquitin-conjugating enzyme E2). Pour ces deux gènes, les amorces ont été sélectionnées à partir des données de séquences porcines disponibles.

Comme pour les données de transcriptome, un modèle de régression linéaire simple a été appliqué aux données de PCR en temps réel.

2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les animaux utilisés dans cette étude sont ceux qui présentent les valeurs de force de cisaillement les plus hautes et les plus basses dans chacune des familles du dispositif expérimental. Ainsi, deux classes d'individus pouvaient être définies. Notre première démarche a été de rechercher des gènes exprimés différemment entre ces deux classes d'individus. Après avoir appliqué un test de Student aux données d'expression de chaque clone dans les deux classes, nous avons pu calculer les p-values ajustées et évaluer le taux de faux positifs (FDR). Cette analyse des données montre que 44 clones présentent un différentiel d'expression (FDR<0,2) entre les deux classes considérées. L'analyse en double classification de ces clones et des échantillons (non présentée) montre un groupe de clones sur-exprimés dans les individus hauts et sous-exprimés dans les individus bas et un deuxième groupe de clones présentant les variations inverses. Cependant la représentation en diagrammes-boîtes des données normalisées des quatre clones les plus significatifs dans cette analyse révèle un faible différentiel d'expression entre les deux classes d'individus et une grande dispersion des valeurs dans chaque classe considérée (Figure 1). Les graphes des données d'expression et de force de cisaillement pour ces mêmes clones montrent en effet qu'il ne semble pas y avoir de relation entre le niveau d'expression et la force pour les valeurs de WBSF<30, alors qu'une corrélation semble se dégager pour les valeurs de WBSF >30 (Figure 1).

Compte tenu des résultats de l'analyse en classification, nous avons appliqué à nos données de transcriptome un modèle de régression linéaire simple dans le but d'identifier des clones dont les variations d'expression peuvent être corrélées aux variations de la force de cisaillement pour des valeurs de WBSF>30. Nous avons pour cela recherché les clones dont la droite de régression établie à partir des données d'expression et des valeurs de WBSF présentait une pente non nulle avec une faible p-value. A partir de ces p-values nous avons pu calculer les p-values ajustées de ces pentes et évaluer un FDR. Cette analyse nous a permis de sélectionner 151 clones significatifs (FDR<0,05). La figure 2A montre, pour les 9 clones les plus significatifs dans cette analyse, les graphes des données de WBSF croissantes contre celles d'expression pour chaque échantillon. La droite tracée est la droite de régression d'équation : Force = α .expression + β . Par ailleurs, nous avons soumis les 151 clones sélectionnés à une analyse selon les forêts aléatoires afin d'identifier les plus importants pour la force de cisaillement. La figure 2B présente leur répartition selon les deux critères d'importance utilisés, les clones ayant les valeurs les plus élevées étant les plus importants. Seuls quelques clones parmi les plus impor-

tants ont aussi les plus petites p-values de pente en régression (Tableau 1).

Nous avons comparé les résultats obtenus par analyse en microréseaux avec une autre approche d'analyse de l'expression des gènes, la RT-PCR en temps réel. Nous avons testé par cette technique 4 gènes significatifs en régression linéaire : deux clones (1 885 et 2 198) ayant un rang faible en forêts aléatoires et deux autres ayant des rangs plus élevés (1 355 et 2 075). Les données obtenues montrent, comme les données microréseaux, une absence de corrélation des valeurs de force de cisaillement avec les données d'expression pour les échantillons ayant des valeurs de WBSF<30. L'analyse en régression linéaire des résultats obtenus pour les échantillons caractérisés par des valeurs de WBSF>30 confirme ceux obtenus par l'approche microréseaux (Figure 3).

Les 151 clones significatifs en régression linéaire correspondent à 56 gènes différents, 33 ayant une annotation en Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/GO.doc.shtml>). Nous trouvons majoritairement des gènes codant des protéines du cytosquelette ou impliqués dans le métabo-

Tableau 1 - Valeurs des pentes des droites de régression, des p-values (Student) et des FDR associés, et rang d'importance selon un critère des forêts aléatoires pour les 12 clones les plus significatifs (en gras) en régression linéaire et pour les 12 clones les plus importants sélectionnés par la méthode des forêts aléatoires parmi les 151 significatifs en régression

N° des clones	P Values	FDR	Pentes	Rang d'importance
1885	9,02E-08	0,0001	50,9	3
2198	1,04E-07	0,0001	-28,7	2
2075	1,96E-06	0,0012	78,4	16
938	4,53E-06	0,0023	61,4	1
1361	9,77E-06	0,0041	59,2	8
76	1,52E-05	0,0054	-30,8	29
2150	2,11E-05	0,0057	70,9	117
2099	2,27E-05	0,0057	-32,5	36
948	2,50E-05	0,0057	64,2	17
385	3,84E-05	0,0076	-49,9	82
358	4,27E-05	0,0076	57,02	44
73	6,13E-05	0,0102	-30,57	126
1440	6,86E-05	0,0107	41,22	6
2342	8,64E-05	0,0120	54,03	9
685	1,51E-04	0,0144	64,17	12
851	1,84E-04	0,0147	-17,93	4
2051	3,54E-04	0,0184	60,47	7
340	4,01E-04	0,0184	47,70	5
1355	4,09E-04	0,0184	52,58	11
158	2,92E-03	0,0499	-16,82	10

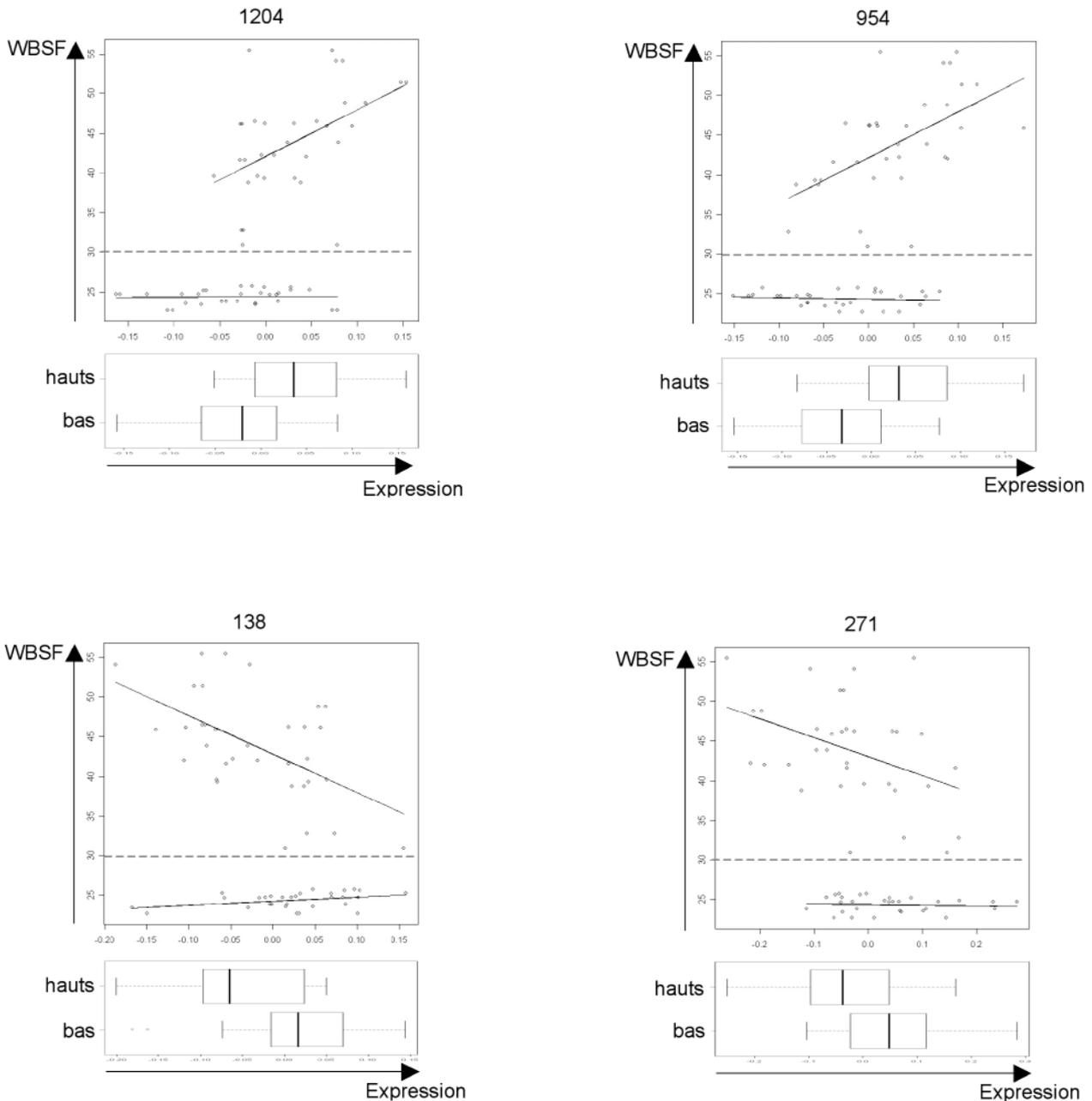


Figure 1 - Graphes des données d'expression et des valeurs de WBSF pour les quatre clones présentant les différentiels d'expression les plus significatifs entre les individus hauts et bas
Les diagrammes-boîtes illustrent les différences de distribution des expressions de ces clones entre les deux classes d'individus

lisme énergétique. Parmi ces gènes, nous avons identifié en particulier le gène codant la titine déjà connu pour subir des modifications en relation avec la force de cisaillement (Morzel et al., 2005). De façon intéressante, nous identifions aussi des gènes impliqués dans d'autres fonctions cellulaires dont la relation avec le tendreté est moins évidente telles que la signalisation inter et intracellulaire ou la régulation de la transcription. Les informations obtenues apportent des données moléculaires complémentaires de données bibliographiques telles que l'influence de la longueur des sarcomères sur la tendreté (Wheeler et al., 2000) et devraient contribuer à une meilleure connaissance des mécanismes cellulaires et moléculaires influençant la tendreté de la viande.

CONCLUSION

Le projet envisagé implique un dispositif expérimental unique de part le nombre d'animaux disponible et le fait qu'il implique des animaux produits à partir de deux lignées mâles commercialement utilisées. Nos résultats nous permettent de valider, sur des animaux de ce dispositif, l'analyse du transcriptome pour identifier des gènes dont l'expression varie en fonction d'un caractère de qualité finale de la viande, la tendreté. Nous avons utilisé deux techniques d'étude du transcriptome : une approche globale via l'utilisation de réseaux d'ADNc, et une approche gène par gène par RT-PCR en temps réel. Nos résultats montrent que quelle que soit la tech-

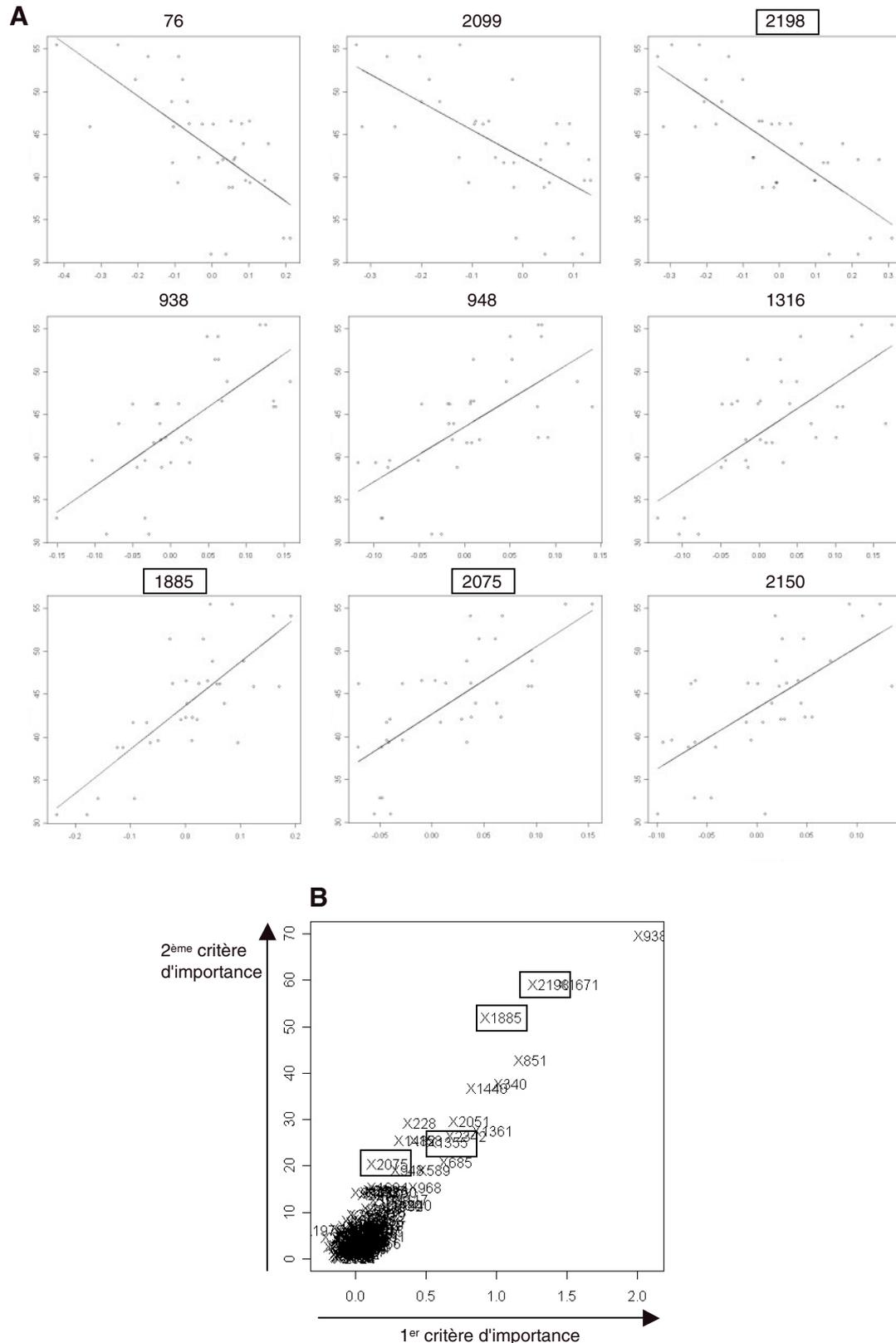


Figure 2 - A : Graphes des données d'expression (en abscisses) et des valeurs de la force de cisaillement (en ordonnées) pour les 9 clones les plus significatifs en régression linéaire simple pour les valeurs de WBSF>30.

La ligne présente la droite de régression

B : Graphes des clones selon les deux critères d'importance des forêts aléatoires.

Les clones testés en RT-PCR semi-quantitative sont encadrés

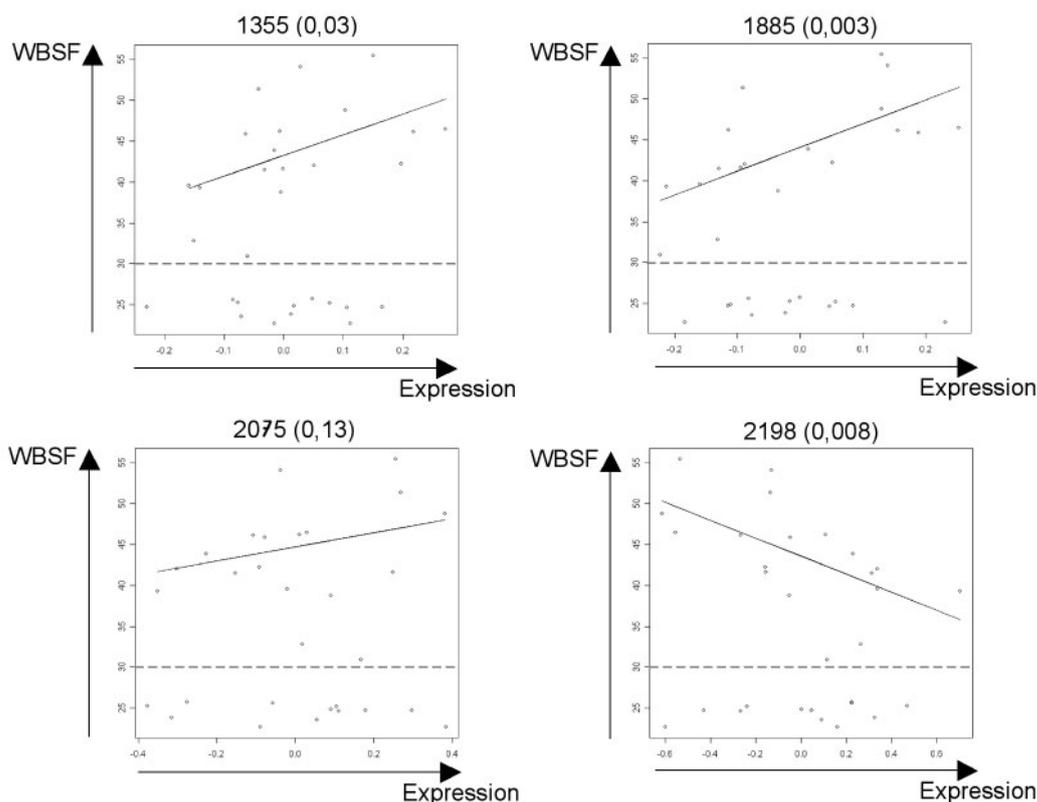


Figure 3 - Graphes des données d'expression obtenues en RT-PCR en temps réel pour 4 gènes et des valeurs de WBSF. Les droites de régression obtenues sur les valeurs de WBSF>30 sont tracées. Entre parenthèses sont mentionnées les p-values des pentes de ces droites.

nique utilisée, le travail d'interprétation des données est fondamental pour identifier les gènes d'intérêt, l'utilisation des réseaux permettant d'avoir un nombre d'informations beaucoup plus important. Dans cette perspective, nous envisageons aujourd'hui la généralisation de cette démarche sur un plus grand échantillon d'animaux (environ 300 porcs) issus de ce protocole afin d'avancer vers notre objectif, utiliser des données de transcriptome obtenues à partir des réseaux d'ADNc pour définir des marqueurs de la tendreté de la longe.

REMERCIEMENTS

Ce projet a reçu le soutien financier du ministère de la Recherche dans le cadre d'un programme PG-ASG (Post

Génome : Après Séquençage Génomique) intitulé « recherche de prédicteurs précoces et de QTL associés aux défauts de qualité de la viande de porc à travers l'analyse du transcriptome » et du Département de Génétique Animale de l'INRA dans le cadre du financement du séjour post-doctoral de V. Lobjois. Les auteurs remercient la plate-forme CRGS de la génopole Toulouse (<http://genopole-toulouse.prd.fr>), en particulier Cécile Donnadieu Tonon et Julien Sarry et Katia Fève pour leur aide dans le développement de l'outil transcriptome et la mise au point de la RT-PCR en temps réel. Nos remerciements vont aussi à Francis Benne et Janine Rallières pour leur soutien technique, à Jérôme Glénisson et José Pires pour les données de texture.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Benjamini Y., Drai D., Elmer G., Kafkafi N., Golani I., 2001. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav. Brain. Res.*, 125, 279-84.
- Breiman L., 2001. Random forests. *Machine Learning* 45, 5-32.
- Fujii J., Otsu K., Zorzato F., de Leon S., Khanna V. K., Weiler J. E., O'Brien P. J., MacLennan D. H., 1991. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*, 253, 448-51.
- Le Roy P., Elsen J. M., Caritez J. C., Talmant A., Juin H., Sellier P., Monin G., 2000. Comparison between the three porcine RN genotypes for growth, carcass composition and meat quality traits. *Genet. Sel. Evol.*, 32, 165-86.
- Lebret B., 2004. Conséquence de la rationalisation de la production porcine sur les qualités des viandes. *Productions animales*, 17, 79-91.
- Livak K. J., Schmittgen T. D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-8.
- Lopez F., Rougemont J., Loriol B., Bourgeois A., Loi L., Bertucci F., Hingamp P., Houlgatte R., Granjeaud S., 2004. Feature extraction and signal processing for nylon DNA microarrays. *BMC Genomics*, 5, 38.
- Maltin C., Balcerzak D., Tilley R., Delday M., 2003. Determinants of meat quality: tenderness. *Proc. Nutr. Soc.*, 62, 337-47.
- Milan D., Jeon J. T., Looft C., Amarger V., Robic A., Thelander M., Rogel-Gaillard C., Paul S., Iannuccelli N., Rask L., Ronne H., Lundstrom K., Reinsch N., Gellin J., Kalm E., Le Roy P., Chardon P., Andersson L., 2000. A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. *Science*, 288, 1248-51.
- Monin G., 2003. Abattage des porcs et qualités des carcasses et des viandes. *Productions animales*, 16, 251-262.
- Monin G., Larzul C., Le Roy P., Culioli J., Mourot J., Rousset-Akrim S., Talmant A., Touraille C., Sellier P., 1999. Effects of the halothane genotype and slaughter weight on texture of pork. *J. Anim. Sci.*, 77, 408-15.
- Morzel M., Bouchut C., Chambon C., Laville E., O'Reilly K., Mullen A.M., 2005. Journées Rech. Porcine, 37, 147-150.
- Muller C., Denis M., Gentzbittel L., Faraut T., 2004. The lccare web server: an attempt to merge sequence and mapping information for plant and animal species. *Nucleic Acids Res.*, 32, W429-34.
- Renand G., Larzul C., Le Bihan-Duval E., Le Roy P., 2003. L'amélioration génétique de la qualité de la viande dans les différentes espèces : situation actuelle et perspectives à court et moyen terme. *Productions animales*, 16, 159-173.
- Shackelford S. D., Wheeler T. L., Koohmaraie M., 2004. Technical note: use of belt grill cookery and slice shear force for assessment of pork longissimus tenderness. *J. Anim. Sci.*, 82, 238-41.
- Wheeler T. L., Shackelford S. D., Koohmaraie M., 2000. Variation in proteolysis, sarcomere length, collagen content, and tenderness among major pork muscles. *J. Anim. Sci.*, 78, 958-65.