

Marqueurs des qualités sensorielles de la viande bovine en race Salers

PICARD B. (1), JURIE C. (1), GARCIA-LAUNAY F. (1), METEAU K. (2), AGABRIEL J. (1), MICOL D. (1)

(1) INRA UR1213, Unité de Recherches sur les Herbivores, Theix, F-63122 Saint-Genès-Champanelle

(2) INRA UE1206, EASM, Le Magneraud, F-17700 Saint Pierre d'Amilly

RESUME

Les travaux de génomique fonctionnelle conduits au cours des dernières années ont permis d'établir une liste de protéines considérées comme des marqueurs de tendreté de la viande bovine. Une technique immunologique de quantification de ces protéines (Dot-Blot) a été mise au point. L'objectif de la présente étude conduite dans le cadre du programme PSDR Salers, était de montrer des spécificités de la race rustique Salers en terme de caractéristiques musculaires et de qualité de viande, et ainsi de vérifier les relations entre les protéines « marqueurs de tendreté » et les qualités sensorielles de la viande. Deux muscles à griller de qualités sensorielles différentes ont été analysés : le *Longissimus thoracis* (entrecôte) et le *Semitendinosus* (rond de gîte) sur 29 taurillons de race Salers. Les propriétés contractiles ont été analysées par séparation des isoformes de chaînes lourdes de myosines par électrophorèse et quantification par densitométrie. 19 protéines identifiées comme marqueurs de tendreté dans divers programmes sur les 3 principales races à viande (Charolaise, Limousine, Blonde d'Aquitaine) ont été quantifiées par dot-blot à l'aide d'anticorps spécifiques de chacune des protéines. Parallèlement les qualités sensorielles : tendreté, jutosité, flaveur ont été estimées par un jury de dégustateurs entraînés. Les résultats obtenus montrent des spécificités de la race Salers. Un résultat original est que plusieurs de ces protéines apparaissent explicatives de la jutosité de la viande. Ces données viennent compléter les données obtenues sur d'autres races par la même démarche et vont être appliquées dans la construction d'un outil de diagnostic (puce à anticorps qui regroupent les anticorps d'intérêt) en cours de développement. Cet outil permettra de définir le potentiel de qualité sensorielle à partir d'un échantillon musculaire prélevé sur l'animal vivant ou sur la carcasse.

Markers of beef sensory qualities in Salers breed

PICARD B. (1), JURIE C. (1), GARCIA-LAUNAY F. (1), METEAU K. (2), AGABRIEL J. (1), MICOL D. (1)

(1) INRA UR1213, Unité de Recherches sur les Herbivores, Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle

(2) INRA UE1206, EASM, Le Magneraud, F-17700 Saint Pierre d'Amilly

SUMMARY

The work on functional genomics developed in recent years have established a list of proteins considered as markers of beef tenderness. An immunological technique for measuring these proteins (Dot Blot) was developed as part of a thesis. In the PSDR Salers program, this method was used to quantify 23 proteins considered as markers of tenderness, of two muscles, the *Longissimus thoracis* and *semitendinosus*, in Salers bulls. Parallel measurements of shear force were made with the Warner-Bratzler method on both muscles. In addition, the sensory qualities: tenderness, juiciness, flavour were estimated by a panel of trained tasters. The objective was to test the relationships between these proteins and sensory qualities, in order to validate these proteins as markers and especially to highlight the specificities of a hardy Salers breed as compared to French beef breeds in which the same types of analysis were performed for the same proteins. The results show the specificities of the Salers breed. In particular, it appears that many of these proteins are also related to the flavour and juiciness of the meat. These data will be applied in the establishment of a diagnostic tool (chip antibodies which include the antibody of interest) being developed that will identify the potential for sensory qualities from a muscle sample coming from living animals or carcasses.

INTRODUCTION

Les qualités sensorielles de la viande bovine, en particulier la tendreté présentent une variabilité forte et non maîtrisée qui est à l'origine d'insatisfaction des consommateurs et contribue à la diminution de la consommation de ce type de viande. De plus à l'heure actuelle, ces qualités ne peuvent être évaluées qu'après l'abattage de l'animal, il n'existe pas de technique applicable sur l'animal vivant. La filière est donc demandeuse d'outils qui permettraient d'évaluer le potentiel qualité d'un animal dès son plus jeune âge. Dans cet objectif, plusieurs programmes ont été conduits durant ces dernières années afin d'identifier des marqueurs génomiques de la tendreté de la viande bovine. Ces travaux ont permis d'établir une liste de marqueurs potentiels de la tendreté (pour revue voir Picard *et al.*, 2010a). Ces protéines sont impliquées dans plusieurs grandes fonctions biologiques notamment les propriétés contractiles et métaboliques, le métabolisme des

lipides, la structure du muscle, le métabolisme du calcium et le stress cellulaire (famille des Heat shock protein : Hsp). Une analyse bioinformatique faite à partir d'une liste de 23 protéines identifiées comme corrélées à la tendreté de la viande dans plusieurs expérimentations différentes, a permis de construire un interactome fonctionnel permettant de mieux comprendre l'élaboration de la tendreté (Guillemin *et al.*, 2011a). Dans cet interactome les relations entre plus de 300 protéines sont établies. L'originalité principale de ce travail est la mise en évidence d'un rôle central des protéines Hsp. Ces Hsp sont réparties en plusieurs familles. En particulier les Hsp20, 27 et α B cristalline appartiennent à la famille dite des « small » Hsp. Elles ont une fonction anti-apoptotique. L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée au cours duquel des enzymes vont dégrader les protéines. L'importance de l'apoptose dans la tendreté a été avancée pour la première fois par Ouali *et al* (2006). Ces protéines ont aussi un rôle de chaperonnes, c'est-à-dire qu'elles assurent

la protection de certaines protéines comme les protéines de structure contre la protéolyse. Une autre famille rassemble les Hsp 70 (Hsp70-1B, 70-8 et 70-GRP75 qui interagissent avec la famille des small Hsp, mais aussi avec Hsp40. Cette dernière correspond au gène DNAJA1 qui a été identifié comme marqueur négatif de la tendreté et pour lequel un brevet a été déposé (Bernard *et al.*, 2007). Les small Hsp interagissent également avec des protéines impliquées dans le stress oxydant comme la superoxy-dismutase (SOD1) et la Peroxy-redoxine 6 (PRDX6). Nous avons montré une relation négative entre l'abondance de PRDX6 et la tendreté, mettant ainsi en évidence pour la première fois une implication du stress oxydant dans l'élaboration de la tendreté de la viande (Guillemin *et al.*, 2011b). Ainsi, de gros progrès ont été accomplis récemment dans notre compréhension des processus biologiques qui contribuent à la tendreté de la viande bovine. L'objectif de nos travaux est maintenant d'arriver à l'élaboration de tests commerciaux de diagnostic basés sur les «marqueurs génomiques» pour estimer le potentiel d'un animal à des fins de sélection, d'adaptation des conduites ou d'orientation vers des circuits de commercialisation de la viande. Cependant, il est nécessaire préalablement de confirmer la pertinence de ces marqueurs avant de pouvoir les insérer dans des tests diagnostics. En effet, ces résultats ont été obtenus essentiellement à partir de travaux conduits sur les trois principales races à viande françaises : Charolaise, Limousine et Blonde d'Aquitaine. Notre démarche est de vérifier si ces marqueurs sont pertinents dans d'autres races telles que les races rustiques et laitières. Dans ce cadre l'objectif de la présente étude était de quantifier ces marqueurs dans une race rustique telle que la Salers et d'analyser la relation entre l'abondance des protéines d'intérêt et les qualités sensorielles de la viande.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. ANIMAUX ET ECHANTILLONS MUSCULAIRES

Ces travaux ont été conduits sur 29 taurillons Salers âgés en moyenne de 15 mois dans le cadre du programme PSDR Salers. Issus d'une expérimentation sur la finition de bovins en race Salers, ces animaux ont reçu différentes quantités de lait et d'aliments concentrés sous la mère avant le sevrage et ont été engraisés sur des régimes de foin et de concentrés, pour atteindre des poids de carcasse de 400 kg (Garcia-Launay *et al.*, 2008). A l'abattoir expérimental du Centre Inra de Clermont-Theix, des échantillons de deux muscles ont été prélevés et congelés directement dans l'azote liquide : le *Longissimus thoracis* (LT : entrecôte) et le *Semitendinosus* (ST : Rond de gîte). Les échantillons des deux muscles pour l'analyse sensorielle ont été maturés sous vide pendant 14 j à 4°C, avant congélation et analyse sensorielle après une cuisson au grill à 55 °C à cœur (Inra EASM, Le Magneraud).

1.2. PROPRIETES CONTRACTILES

Les isoformes de la chaîne lourde de myosine (MyHC) : I, IIA et IIX, indicatrices des propriétés contractiles, ont été séparées en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse selon le protocole décrit dans Picard *et al.* (2011) et quantifiées par densitométrie.

1.3. ABONDANCE DES PROTEINES

L'abondance de 19 protéines (tableau 2), identifiées comme marqueurs de tendreté dans différents programmes précédents a été quantifiée par la technique de Dot-Blot, (Guillemin *et al.*, 2009). Ce dosage immunologique est basé sur l'utilisation d'anticorps spécifiques de chacune des protéines étudiées. La spécificité et les conditions d'utilisation de ces anticorps sur muscle bovin ont été préalablement déterminées par western-blot.

1.4. ANALYSE SENSORIELLE

Un jury entraîné d'analyse de 12 membres a évalué les qualités sensorielles de 0 à 10 (échelle de 100 mm sans repère intermédiaire) pour la tendreté globale (0 = très dur, 10 extrêmement tendre), la jutosité (0 = très sec, 10 = extrêmement juteux), la flaveur spécifique de viande de bœuf (0 = sans flaveur aucune, 10 = flaveur extrêmement prononcée) et l'appréciation globale (0 = mécontentement très fort, 10 contentement extrême). Avant la session d'analyse, les steaks ont été décongelés au moins 24 h entre 2 à 5 °C. Les steaks ont été apprêtés à 1,5 cm d'épaisseur et placés à température ambiante (18 °C) avant la cuisson. Ils ont été grillés, entre deux feuilles d'aluminium, sur un grill à doubles plaques cannelées, préchauffé avant la cuisson à 310 °C (30 min au moins). Pour suivre la température interne souhaitée de cuisson de 55 °C, une sonde thermique a été placée au centre géométrique du steak, le temps de cuisson a été noté. Dès l'obtention de la température de 55 °C, les échantillons de steaks de 3x2x1,5 cm ont été coupés et servis immédiatement aux membres du jury. Les jurés ont évalué 6 steaks par séance et disposaient d'eau, de pain et d'un fruit pendant la séance. La moyenne des notes des différents jurés a été calculée et retenue par steak et par critère sensoriel pour les calculs et analyses statistiques ultérieures.

1.5 ANALYSE STATISTIQUE

Une analyse des corrélations (Pearson) entre l'abondance de chacune des 19 protéines et les données sensorielles a été réalisée par la procédure CORR de SAS (SAS, 1990, Cary, NC, USA). La procédure de régression multiple REG (options stepwise et rsquare) a été utilisée pour l'étude des parts de variance expliquées par les différentes abondances de protéines sur les attributs de l'analyse sensorielle.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. ANALYSE SENSORIELLE

Les données d'analyse sensorielle sont présentées dans le tableau 1. Comme attendu l'entrecôte présente des qualités sensorielles supérieures à celles du rond de gîte, que ce soit en terme de tendreté globale, jutosité, flaveur et appréciation globale.

Tableau 1 : Notes de 0 à 10 d'attributs sensoriels des muscles *Longissimus thoracis* (LT) et Muscle *Semitendinosus* (ST).

Moyenne (écart type), minimum - maximum

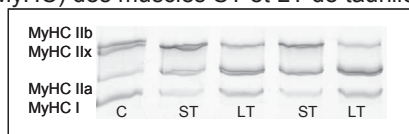
	LT	ST
Tendreté globale	4,85 (0,59) 3,50 – 3,06	3,73 (0,32) 3,13 – 4,27
Jutosité	4,45 (0,40) 3,63 – 5,15	3,67 (0,35) 3,13 – 4,46
Flaveur	4,22 (0,33) 3,53 – 4,83	3,88 (0,36) 3,14 – 4,62
Appréciation Globale	3,14 (0,48) 2,18 – 4,17	2,32 (0,42) 1,49 – 3,32

2.2. PROPRIETES CONTRACTILES

Concernant les propriétés contractiles des deux muscles ST et LT, par références aux données de la base Bif-Beef concernant des taurillons d'âge comparable (Chriki *et al.*, 2011), il apparaît que la proportion en différents types de fibres du muscle ST est peu différente de celle de la moyenne des races bovines (en moyenne en Salers fibres I : 9% versus 11%, fibres IIA : 30% versus 27%, fibres IIX : 61% versus 63%). En revanche, les caractéristiques contractiles du muscle LT sont très différentes de la moyenne des autres races (en moyenne en Salers fibres I : 27% versus 33%, fibres IIA : 52% versus 17%, fibres IIX : 21% versus 50%). L'illustration en figure 1, permet d'observer les propriétés des deux muscles. Elle montre également que l'isoforme de

MyHC IIb n'est pas retrouvée en race Salers. Cette isoforme peu fréquente dans les muscles bovins se trouve en proportion élevée en race Limousine et Blonde d'Aquitaine et en très faible proportion en Charolaise (Picard *et al.*, 2010b). Sa relation avec la tendreté de la viande a été montrée en race Blonde d'Aquitaine. Son absence en race Salers, est en cohérence avec l'hypothèse que son expression pourrait être associée à la sélection sur la masse musculaire.

Figure 1 : Séparation des isoformes de chaînes lourdes de myosine (MyHC) des muscles ST et LT de taurillons Salers.



C : muscle LT de taurillon Limousin utilisé comme contrôle renfermant 4 isoformes de MyHC)

2.3. ABONDANCE DES PROTEINES ET TENDRETE

Les résultats des corrélations entre l'abondance des 19 protéines quantifiées et les qualités sensorielles sont présentés dans le tableau 2.

Les résultats obtenus montrent que seulement une protéine (CapZ- β , protéine de structure) présente une tendance à être corrélée avec la tendreté globale dans le muscle ST. Dans le muscle LT, deux protéines sont corrélées à la tendreté globale, mais avec des niveaux de signification très faibles.

La protéine Hsp40 correspondant au gène DNAJA1 est corrélée à la tendreté uniquement dans le LT, en accord avec les données précédemment obtenues (Cassar-Malek *et al.*, 2011).

Tableau 2 Corrélations de Pearson entre les valeurs d'abondance des 19 protéines et les données d'analyse sensorielle

T : P<0,1, * : P<0,05, ** : P<0,01, *** : P<0,001

Protéines de structure : CapZ- β , desmine ; du métabolisme : PGM : phosphoglucomutase, LDH : lactate deshydrogénase, émolases 1 et 3 ; heat shock protein : Hsp 20, 27, 40, 70-1B, 70-8, 70-GRP75, α B-crystalline ; du stress oxydant : PRDX6 : peroxyredoxin 6, SOD1 : super-oxyde dismutase ; de la protéolyse : m- et μ -calpaïnes ; contractiles : MLC1-F : myosin light chain, MyBP-H : myosin binding protein H, MyHC : myosin heavy chain I, IIx, II (=IIa+IIx)

Protéines (n=19)	Muscle <i>Longissimus thoracis</i>			Muscle <i>Semitendinosus</i>		
	Tendreté	Jutosité	Flaveur	Tendreté	Jutosité	Flaveur
CapZ- β				-0,35 t		
PGM		+0,35 t				
LDH-B						+0,31 t
Enolase 3			+0,31 t		-0,45 (*)	
DJ-1		-0,54 **			-0,71 ***	+0,41 *
Hsp 20		-0,39 *				
Hsp27					-0,33 t	
α B-crystalline		-0,38 *				
Hsp 40	+0,34 t	-0,32 t			-0,37 *	
Hsp 70-1B						
Hsp 70-8			+ 0,31 t			
Hsp 70-GRP75		-0,37 *	+0,40 *		-0,63 ***	+0,36 t
PRDX6						
SOD1						+0,32 t
MLC1-F		-0,37 *				
MyBP-H		-0,35 t			-0,42 *	
MyHC I						
MyHC II	+0,31 t				-0,47 **	
MyHC IIx					-0,49 **	

Nous pouvons ainsi confirmer à partir de ces données que les protéines considérées comme marqueurs de tendreté pour les trois principales races à viande bovine françaises ne le sont pas pour une race rustique comme la Salers. Ceci est en accord avec une première étude qui avait montré par analyse protéomique (électrophorèse bidimensionnelle et spectrométrie de masse) que les protéines différentes entre lots de tendreté extrême étaient différentes entre les deux races à viande Charolaise et Limousine et la race Salers (Bouley *et al.*, 2004). D'autres travaux ont montré que les muscles de la race Salers avaient des propriétés musculaires différentes de celles des races à viande : plus de fibres de type lent oxydatif, plus de collagène et plus de lipides intramusculaires (Picard *et al.*, 2007). Ces propriétés peuvent expliquer les différences observées dans la tendreté de la viande entre races. Ceci implique que des études complémentaires sont nécessaires pour approfondir la recherche de marqueurs de tendreté dans les différents types de bovins. Les résultats issus de la recherche de marqueurs génétiques de la tendreté de Allais *et al* (2011) vont dans le sens de nos résultats.

En effet, ces auteurs ont mis en évidence des gènes candidats marqueurs de tendreté ou de persillé, différents dans les trois principales races à viande.

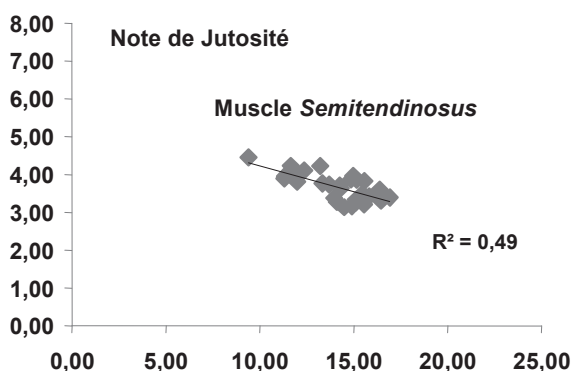
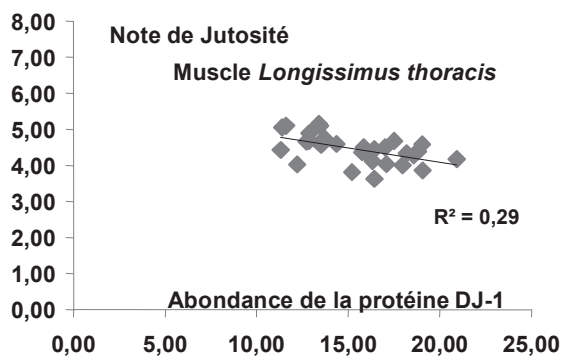
D'autre part, les travaux de Guillemain *et al* (2011b) ont montré que les protéines analysées étaient plus corrélées à la tendreté de la viande mesurée par mesures mécaniques qu'avec les notes d'analyse sensorielle. Des données de mesures de force de cisaillement sont en cours d'obtention sur ces 29 taurillons Salers. Nous pourrions ainsi vérifier les relations entre ce paramètre et l'abondance des 19 protéines. Nous envisageons également de calculer un indice de tendreté combinant les résultats de mesures mécaniques et d'analyse sensorielle.

2.4. ABONDANCE DES PROTEINES ET JUTOSITE ET FLAVEUR

Un résultat très original de cette étude est que l'abondance d'un grand nombre des protéines quantifiées est corrélée à la jutosité de la viande (tableau 2) (8 dans le LT et dans le ST) et dans une moindre mesure à la flaveur (3 dans le LT et 4 dans le ST). En particulier, l'abondance des protéines DJ-1 et Hsp 70-GRP75 est corrélée négativement à la jutosité dans les deux muscles et avec des niveaux de signification élevés (DJ-1 : p<0,01 dans le LT et p<0,001 dans le ST, Hsp 70-GRP75 : p<0,05 dans le LT et p<0,001 dans le ST). Une

analyse par régression multiple faite à partir des 8 protéines corrélées à la jutosité pour chacun des 2 muscles a révélé que nous expliquons 34% de la variabilité dans le LT et 49% dans le ST. De manière très intéressante, il apparaît que la protéine DJ-1 explique à elle seule 29 % de la jutosité dans le LT et 49% dans le ST (figure 2).

Figure 2 : Relations entre l'abondance de la protéine musculaire DJ-1 et l'appréciation sensorielle de la jutosité de la viande dans les muscles *Longissimus thoracis* (LT) et *Semitendinosus* (ST).



La protéine DJ-1, codée par le gène PARK7 est impliquée dans la maladie de Parkinson. Elle a une fonction anti-apoptotique et de protection contre le stress oxydant. Dans l'interactome de Guillemain *et al* (2011a) il a été montré que cette protéine interagit avec la famille des small Hsp par l'intermédiaire de Hsp27. Chelh *et al*. (2009) ont montré que chez les bovins culards, on observe une surexpression du gène PARK7 induisant une abondance plus élevée de la protéine DJ-1. Ainsi cette protéine est associée positivement avec la masse musculaire et négativement avec la jutosité. Ceci est cohérent puisque la viande des bovins culards est réputée pour être peu juteuse. Toutefois, la compréhension de l'implication de cette protéine dans la jutosité de la viande demande des analyses plus approfondies.

CONCLUSION

Cette étude démontre d'une part que la tendreté de la viande en race rustique Salers, a une origine biologique différente de celle des races à viande spécialisées. Les marqueurs identifiés dans ces races ne peuvent pas être appliqués pour estimer le potentiel de tendreté. Des analyses

complémentaires sont nécessaires pour révéler des marqueurs spécifiques aux races rustiques. D'autre part, cette étude a permis de révéler pour la première fois une relation entre certaines des protéines étudiées et la jutosité de la viande. En particulier, la protéine DJ-1 apparaît comme un bon marqueur de jutosité chez les taurillons Salers, dans les deux muscles étudiés. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives. Des études sont en cours pour vérifier ces relations dans d'autres races bovines.

Les relations mises en évidence avec la jutosité ouvrent de nouvelles applications pour le développement d'un test immunologique de type puce à anticorps, utilisable pour estimer le potentiel « qualités sensorielles : tendreté, jutosité, flaveur » des animaux à partir de biopsies musculaires ou après abattage. Cet outil est en cours de développement dans notre équipe.

Cette étude a été financée par le programme PSDR Salers 2009-2011 conduit en collaboration avec l'UPRA Salers. Les auteurs remercient le personnel du Domaine Expérimental des Monts d'Auvergne pour la conduite des animaux, de l'abattoir expérimental du Centre Inra de Clermont-Theix pour l'abattage des animaux et les prélèvements musculaires, et Nicole Dunoyer pour les quantifications de l'abondance des protéines.

- Allais S., Journaux J., Levéziel H., Payet-Duprat N., Raynaud P., Hocquette J.F. et al, 2011. Journal of Animal Sciences, 89, 1-11.. Anim. Sciences
- Bernard C., Cassar-Malek I., Le Cunff M., Dubroeuq H., Renand G., Hocquette J.F., 2007. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55 (13), 5229-37.
- Bouley, J., Meunier, B., Culioli, J., Picard, B., 2004. , Rencontres Recherches Ruminants, 87-89.
- Cassar-Malek, I., Guillemain, N., Hocquette, J.F., Micol, D., Bauchart, D., Picard, B., Jurie, C., 2011. Animal, 5 (6), 867-874.
- Chelh I., Meunier B., Picard B., Reecy M.J., Chevalier C., Hocquette J.F., Cassar-Malek I., 2009. BMC Genomics 10, 196-209.
- Chriki S., Picard B., Jurie C., Reichstadt M., Micol D., Brun J.P., Journaux L., Hocquette J.F., 2011. Meat Sciences, sous presse.
- Garcia-Launay F., Garel J.P., Micol D., Agabriel J. 2008. Rencontres Recherches Ruminants, 15, 263-266.
- Guillemain, N., Meunier, B., Jurie, C., Cassar-Malek, I., Hocquette, J.F., Levéziel, H., Picard, B., 2009. J. of Physiology and Pharmacology, 60, 91-97.
- Guillemain N., Bonnet M., Jurie C., Picard B., 2011a. Journal of proteomics, Sous Presse.
- Guillemain N., Guillemain N., Jurie C., Micol D., Renand G., Hocquette J.F., Picard B., 2011b, in Proceedings of the 57th ICoMST, 7-12 August 2011, Ghent (Belgique), p109
- Ouali A., Ouali A, Herrera-Mendez CH, Coulis G, Becila S, Boudjellal A, Aubry L, et al. 2006. Meat Sci. 2006;74:44-58.
- Picard, B., Jurie, C., Bauchart, D., Dransfield, E., Ouali, A., Martin, J.F., Jaille, R., Lepetit, J., Culioli, J., 2007. Sciences des Aliments, 27, 168-180.
- Picard, B., Berri, C., Lefaucheur, L., Molette, C., Sayd, T., Terlouw, C., 2010a. Briefings in Functional Genomics and Proteomics, 9, 259-78.
- Picard B., Allais S., Jurie C., Cassar-Malek I., Leveziel H., Journaux L., Renand G., 2010b. In: Proceedings of the 61st Annual Meeting of the European Association for Animal Production (EAAP), 2010, Heraklion, (Greece).
- Picard B., Barboiron, B., Chadeyron D., Jurie C., 2011. Electrophoresis, sous presse.