

Cartographie des protéines du muscle *Semitendinosus* de bovins par électrophorèse bidimensionnelle et spectrométrie de masse

Mapping of proteins in *Semitendinosus* bovine skeletal muscle using two-dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprinting

J. BOULEY (1), C. CHAMBON (2), B. PICARD (1)

(1) INRA Unité de Recherches sur les Herbivores, Equipe Croissance et Métabolisme du Muscle, Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle

(2) Station de Recherches sur la Viande, Plateforme protéomique, Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle

INTRODUCTION

Dans un objectif de maîtrise de la qualité de la viande bovine, les recherches sur le muscle squelettique portent particulièrement sur les caractéristiques impliquées dans la qualité sensorielle de la viande. En particulier, le type de fibres, la teneur et la solubilité du collagène et l'activité des protéases sont les plus importants paramètres physiologiques qui déterminent la tendreté de la viande. La teneur et la composition en lipides contribuent quant à elles à déterminer la saveur. Cependant, ces différentes caractéristiques expliquent moins d'un tiers de la variabilité de la tendreté. Aussi, une des priorités dans les recherches sur les déterminants de la qualité sensorielle de la viande est d'identifier des caractéristiques musculaires liées à cette qualité. Récemment, les approches globales telles que l'analyse protéomique ont été utilisées pour comprendre la biologie du muscle. Ainsi, l'objectif de ce travail est de développer un système reproductible de séparation, par électrophorèse bidimensionnelle (2DE), des protéines du muscle squelettique de bovin. La distribution du phénotype protéique peut être interprétée biologiquement quand la 2DE est couplée avec des méthodes d'identification des protéines comme la spectrométrie de masse. Par ailleurs, l'analyse informatisée des gels permet la comparaison d'échantillons et la découverte de protéines variablement exprimées parmi les centaines de protéines visualisées. Une première étape a consisté en l'élaboration d'une carte protéique du muscle de bovin.

1. MATERIEL ET METHODES

Des échantillons de muscle *Semitendinosus* de taurillons de 15 mois ont été prélevés après l'abattage et conservés à -80°C avant l'extraction des protéines. Les tissus congelés sont homogénéisés dans un tampon de lyse (8.3M urée, 2M thiourée, 1 % DTT, 2 % ampholytes) puis 800 µg de protéines sont séparées par 2DE. Les protéines sont ensuite révélées par coloration au bleu de Coomassie colloïdal. Les gels sont scannés à 400 dpi afin d'être analysés par le logiciel ImageMaster 2D Elite (Amersham). La calibration des gels en terme de masse moléculaire et de point isoélectrique a été réalisée par l'utilisation de marqueurs protéiques et de protéines de référence distribuées à travers le gel. De manière à identifier les protéines, elles sont prélevées sur les gels pour l'analyse par spectrométrie de masse.

Après décoloration des pièces de gels, les protéines subissent une digestion à la trypsine. La masse des peptides tryptiques est déterminée dans un spectromètre de masse MALDI-TOF Voyager-DE Pro (Applied Biosystems). Les résultats (masse expérimentale des peptides) sont comparés à ceux générés par les bases de données (SWISS-PROT, NCBI) afin d'identifier les protéines.

2. RESULTATS

Nous présentons ici une carte protéique de muscle de bovin. Les protéines (600) sont visualisées sur un gradient de pH 4 à 7 pour une masse moléculaire comprise entre 10 et 150 kDa (Figure 1).

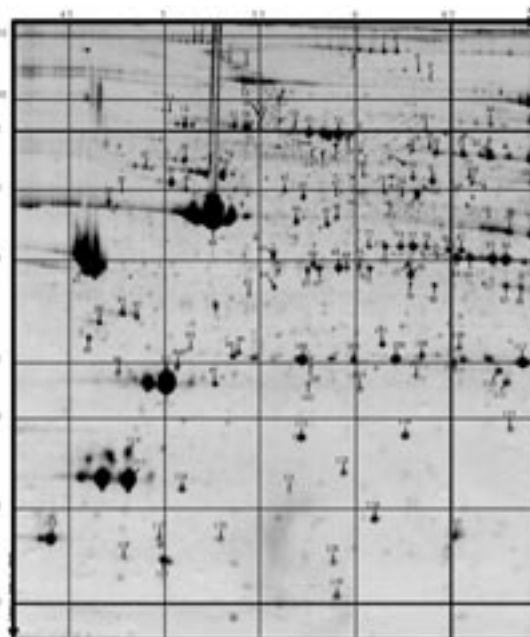


Figure 1 : 800 µg de protéines musculaires séparées par 2DE et visualisées au bleu colloïdal. Gradient de pH 4-7 et gel de polyacrylamide 11 %. Les numéros indiquent les protéines identifiées par MALDI-TOF.

L'analyse protéomique du muscle de bovin nous a permis d'identifier jusqu'à présent 129 spots protéiques correspondant à 75 produits de gènes différents. La majorité appartient (1) aux protéines du cytosquelette (16 %), (2) à l'appareil contractile (16 %), (3) aux enzymes du métabolisme (22 %) et (4) aux protéines de défense cellulaire (16 %). Le reste des protéines fait partie d'un large éventail de types protéiques (protéines de transport, protéolyse...). Cette carte sera complétée au fur et mesure des études.

CONCLUSION

Ce travail a été réalisé dans l'objectif de décrire quel type de protéines peut être visualisé par 2DE. Cette approche a permis d'identifier la présence de quatre classes majeures de protéines dans le muscle de bovin. A l'heure actuelle, des muscles classés sur des critères de tendreté ou de caractéristiques musculaires particulières (hypertrophie musculaire) sont comparés entre eux selon cette approche.

Ce travail a reçu un soutien financier d'AGENAE.