

« Ce que la génomique fonctionnelle peut apporter à la filière viande bovine ».

J.F. HOCQUETTE, I. CASSAR-MALEK, A. LISTRAT, B. PICARD

INRA Centre de Clermont-Ferrand/Theix, Unité de Recherches sur les Herbivores (URH), Equipe Croissance et Métabolismes du Muscle (C2M), 63122 Saint-Genès Champanelle.

RESUME - Les caractéristiques musculaires qui déterminent la qualité de la viande bovine dépendent du patrimoine génétique des animaux et des conditions d'élevage (nutrition, mode de conduite). Notre approche de la biologie musculaire a été fortement changée par la génomique. La génomique fonctionnelle est en effet une nouvelle méthode d'investigation du vivant, basée sur le développement de techniques à grande échelle (séquençage de l'ADN, analyse de l'expression des gènes) et permettant l'analyse simultanée de centaines de gènes. Ces techniques permettent en effet une vision globale des caractéristiques de l'ensemble des gènes exprimés dans le muscle. La stratégie scientifique la plus porteuse d'avenir est certainement l'intégration des connaissances en combinant les résultats issus de la génomique avec des données de biologie musculaire et avec des informations relatives à la qualité finale de la viande. Concrètement, la génomique fonctionnelle permettra ainsi d'identifier de nouveaux gènes qui expliquent la variabilité des caractéristiques du muscle et de la qualité de la viande bovine. Si l'importance de ces gènes est due à leur polymorphisme, ils pourront être utilisés pour améliorer la sélection génétique des reproducteurs. Si l'importance de ces gènes est liée à une régulation de leur expression par des facteurs environnementaux, leur expression pourra être maîtrisée par les facteurs d'élevage (niveau et nature de l'alimentation, mode de conduite, ...) afin d'améliorer la qualité de la viande. Dans les deux cas, les techniques de génomique seront très probablement automatisées pour être, à moyen terme, utilisables en routine pour la filière. Les premières études de génomique réalisées à ce jour ouvrent effectivement de nouvelles perspectives pour atteindre ces objectifs.

« The contribution of functional genomics to bovine meat production ».

J.F. HOCQUETTE, I. CASSAR-MALEK, A. LISTRAT, B. PICARD

INRA Clermont-Ferrand/Theix Research Centre, Herbivore Research Unit (URH), Muscle Growth and Metabolism Group (C2M), 63122 Saint-Genès Champanelle.

SUMMARY - The muscle characteristics that determine the quality of beef depend on the animals' genetic heritage and the rearing conditions (nutrition, management). Our approach to muscle biology has been profoundly altered by the advent of genomics. Functional genomics is a new method of investigating living matter based on the development of large scale techniques (DNA sequencing, gene expression analysis) that allow hundreds of genes to be analyzed simultaneously. Indeed, these techniques give an overall view of the characteristics for all the genes expressed in the muscle. The most promising scientific strategy for the future is certainly the integration of knowledge acquired, combining results obtained by genomics with muscle biology data and information concerning the final quality of the meat. In concrete terms functional genomics will thus enable new genes to be identified that explain the variability in muscle characteristics and beef meat quality. If the importance of these genes is due to their polymorphism, they could be used to improve genetic selection of breed animals. If their importance is connected with the regulation of their expression by environmental factors, their expression could be controlled by rearing factors (quantity of feed, management, type of feed, etc) in order to improve the quality of the meat obtained. In both cases genomics techniques will very probably be automated so that in the medium term they could be used routinely for the profession. The first genomics studies carried out so far do indeed open new prospects for attaining these goals.

INTRODUCTION

Pour répondre aux attentes des consommateurs, la viande bovine doit être aujourd'hui sans risque pour la santé humaine à la fois sur le plan sanitaire et nutritionnel (par exemple avec peu de lipides saturés) et aussi de qualité constante et élevée (notamment en ce qui concerne la tendreté).

Cependant, les qualités sensorielles de la viande bovine dépendent de mécanismes complexes et multifactoriels. Il est ainsi connu que la qualité sensorielle de la viande est liée en partie aux conditions d'abattage et aux procédés de transformation (revue de Culioli, 1999). De plus, les différentes caractéristiques musculaires de l'animal vivant connues à ce jour (fibres, collagène, lipides, protéases) jouent aussi un rôle sur la qualité de la viande, comme par exemple sa tendreté. Mais, des résultats récents (Dransfield *et al.*, 2003) ont montré qu'une part modeste (30% au plus) de la variabilité de la tendreté entre muscles ou entre animaux est expliquée par l'ensemble des caractéristiques musculaires analysées.

Il s'avère donc important d'identifier de nouvelles caractéristiques musculaires qui auraient une forte influence sur la qualité de la viande. Il est tout aussi important que ces caractéristiques puissent être mesurées en routine avant l'abattage par le sélectionneur ou par l'éleveur afin de pouvoir prédire le potentiel d'un animal à produire une viande présentant des critères de qualité recherchés. Pour atteindre ces objectifs, nous développons une approche de biologie intégrative. Le principe de cette approche est d'associer des recherches au niveau des gènes (génomique

fonctionnelle) à des approches plus classiques (biochimie du muscle, zootechnie) (Figure 1). L'intérêt de cette démarche est d'utiliser les techniques à grande échelle de génomique pour appréhender simultanément tous les gènes du muscle. L'apport principal pour la filière est l'identification de gènes prédicteurs de la qualité de la viande. En fonction des facteurs agissant sur ces gènes (polymorphisme génétique ou régulation de leur expression par le mode d'élevage), la connaissance de ces gènes sera utile, soit pour l'amélioration de la sélection génétique soit pour optimiser le mode de conduite des animaux.

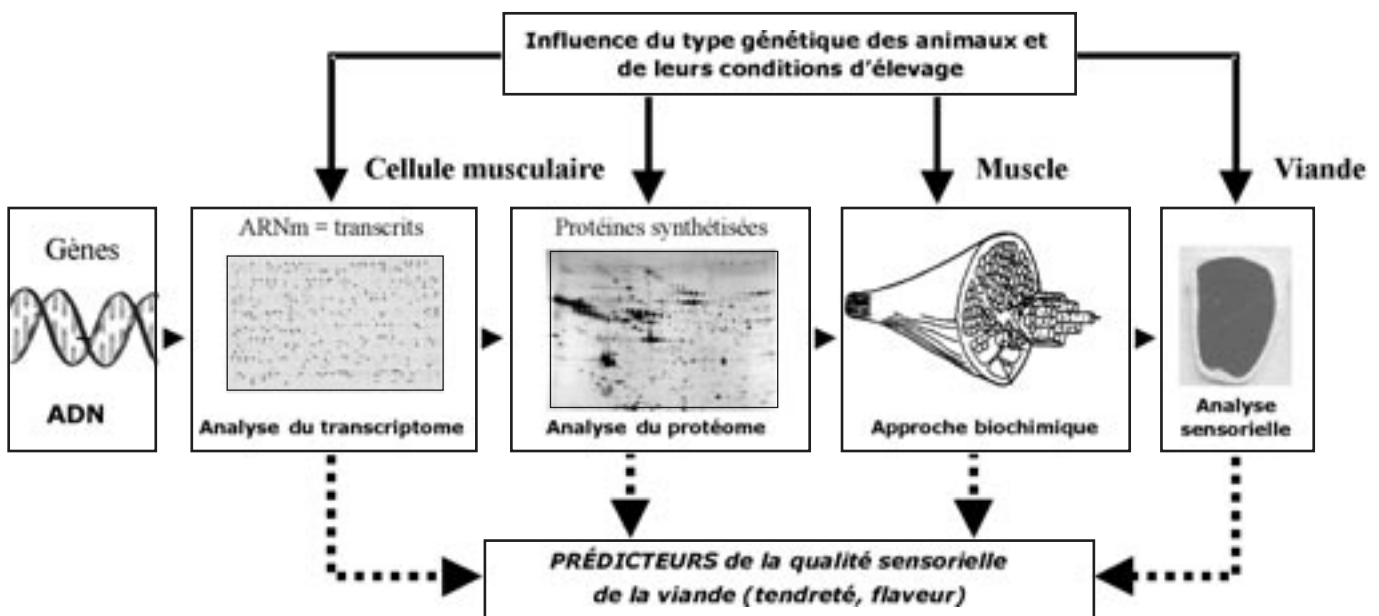
1. QU'EST CE QUE LA GENOMIQUE ?

La *génomique* est la Science qui étudie le génome, c'est à dire l'ensemble des gènes portés par les chromosomes.

La génomique s'intéresse tout d'abord à la cartographie physique des génomes et à la structure des gènes. Il s'agit de la *génomique structurale* qui étudie l'ADN, support biologique de l'information génétique mais qui ne sera pas détaillée dans cette revue.

Parallèlement, la *génomique fonctionnelle* a pour objet de préciser les fonctions biologiques des gènes. Un des moyens d'étudier ces fonctions est d'analyser les mécanismes de la régulation de l'expression des gènes : il s'agit alors de la *génomique expressionnelle*. Cette dernière s'adresse donc seulement aux gènes qui sont exprimés. Ils ne représentent qu'une faible partie du génome (de l'ordre de 3 à 5 % au moins chez l'homme) mais probablement la plus importante car réellement fonctionnelle.

Figure 1 : La "biologie intégrative" au service de la compréhension des mécanismes biologiques du muscle qui contrôlent la qualité sensorielle de la viande.



Quand un gène est exprimé, les cellules synthétisent au moins un ARN messager (ARNm) à partir de ce gène. Ce messager (ou transcrite) permet la synthèse d'une protéine spécifique (ou d'une famille de protéines). La présence ou l'activité biologique de cette protéine peut modifier certaines caractéristiques du muscle qui déterminent la qualité de la viande (Figure 1). L'enjeu est d'identifier ces protéines et donc les gènes importants pour la qualité de la viande. Ces protéines, ou ces gènes, seront alors considérés comme des prédicteurs de la qualité de la viande (Figures 1 et 2).

L'automatisation des techniques de biologie moléculaire permet d'étudier la quasi totalité des ARNm présents dans le muscle à un instant donné (il s'agit du transcriptome) (Figures 1 et 2). Le développement à grande échelle d'autres techniques automatisées a conduit à l'étude du protéome (ensemble des protéines dans un tissu). Ces techniques sont basées sur l'un des grands principes suivants : (i) la fixation des ARNm tissulaires sur un répertoire de gènes préalablement déposés sur un support en nylon ou en verre (technologie des puces à ADN, Figure 2), (ii) la séparation des protéines présentes dans le muscle ou (iii) la fixation des protéines tissulaires sur une collection d'anticorps (puce à anticorps). Dans tous les cas, une étape d'analyse d'image est nécessaire pour la quantification des résultats.

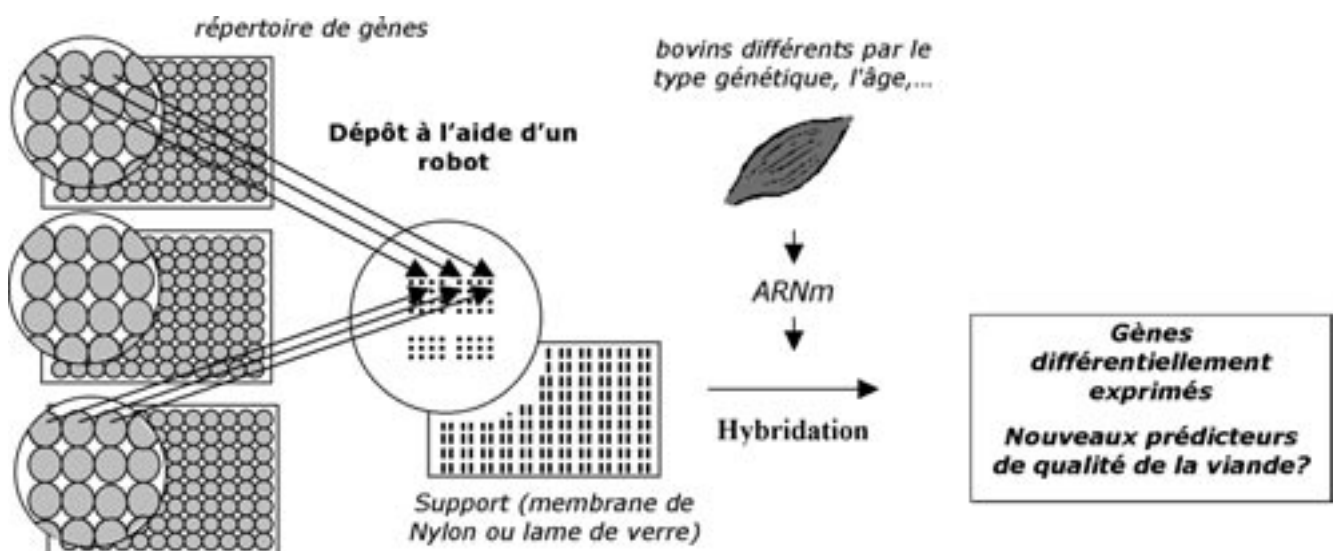
La génomique est donc une nouvelle science, située entre la génétique et la physiologie, qui découle des innovations technologiques récentes (puces à ADN, etc.). Elle génère de très nombreuses données en raison du caractère automatisé des techniques à grande échelle. Elle autorise de ce fait une vision globale, c'est à dire intégrée, des gènes à la qualité de la viande en passant par les ARNm, les protéines, etc. Il s'agit de la *biologie intégrative* (Figure 1). Cette dernière ne

peut se développer sans un stockage raisonné et une analyse globale des données générées par la génétique, la génomique et la physiologie. Ces étapes nécessitent des outils informatiques, c'est pourquoi l'informatique appliqué à la biologie (ou bio-informatique) est une autre science en expansion.

Une perspective importante des avancées en génomique fonctionnelle est certainement la création d'outils moléculaires (puces à ADN ou à anticorps) pour avoir une approche globale des fonctions physiologiques par l'expression des gènes. Autrement dit, nous aurons accès à une véritable "carte d'identité" d'un tissu donné dans un organisme. En effet, le profil d'expression des gènes est tissu-spécifique et il varie avec le temps et les conditions environnementales. Cette "carte d'identité" tissulaire (basée sur les ARNm et les protéines) sera plus informative que la "carte d'identité génétique" basée sur l'ADN et dépendant de ce fait uniquement du patrimoine génétique de l'organisme. Il sera ainsi possible de prédire l'évolution des caractéristiques d'un tissu en fonction du temps, des conditions d'alimentation, du mode de vie, etc. Par exemple, on pourrait espérer une information apportée sur l'évolution potentielle des muscles de chaque brouillard avant la mise en engraissement et utiliser par là au mieux le potentiel biologique de l'animal.

Bien que cette perspective soit très futuriste, elle est sérieusement prise en considération par le corps médical, notamment en médecine préventive (Noonan, 2002). Sur le plan technique, rien ne s'oppose en effet au développement d'outils moléculaires de routine, si ce n'est la standardisation des méthodes d'étude du transcriptome ou du protéome afin de rendre leur utilisation possible en dehors des laboratoires de recherche.

Figure 2 : Conception et utilisation d'outils moléculaires d'analyse du transcriptome pour l'identification de nouveaux prédicteurs de la qualité de la viande bovine (figure adaptée de Hately, 2000).



2. CONTRIBUTION DE LA GENOMIQUE A LA PRODUCTION D'UNE VIANDE DE QUALITE

2.1. ETAT DES LIEUX

Les caractéristiques musculaires qui déterminent la qualité de la viande dépendent du patrimoine génétique des animaux et des facteurs d'élevage tels que la nutrition et le mode de conduite (au pâturage ou à l'auge, etc.) (Geay et Renand, 1994). Ainsi, les facteurs de production, en particulier le choix du type d'animal (race, sexe) et l'alimentation des ruminants sont au centre des préoccupations des consommateurs, notamment à la suite des crises fortement médiatisées qui ont frappé la filière "viande bovine" (crise de l'ESB).

Les sélectionneurs ou les autres acteurs de la filière "viande bovine" sont à la recherche de méthodes de mesure en routine des caractéristiques musculaires connues pour jouer un rôle dans le déterminisme de la tendreté ou de la saveur (caractéristiques des fibres musculaires, de la trame conjonctive, des lipides intramusculaires, ...). Si ces méthodes étaient disponibles, elles seraient d'un intérêt majeur pour analyser notamment la variabilité entre muscles, premier facteur de variation de la tendreté et de la saveur. Or, les méthodes disponibles sont longues, coûteuses et supposent la disponibilité d'expérimentateurs bien formés. De ce fait, elles sont rarement automatisables, et ne peuvent pas couvrir la demande croissante de la filière à l'exception peut-être de la spectroscopie fluorescente qui apparaît comme une méthode pertinente pour estimer la tendreté de la viande (Dufour et Frencia, 2001).

La part de la variabilité de la qualité de la viande expliquée par les facteurs génétiques est, chez le Bovin, de l'ordre de 20-25% pour les tests de dégustation, la force de cisaillement, la couleur, et la perte en eau (revues de Bertrand *et al.*, 2001 ; Burrow *et al.*, 2001 et Renand *et al.*, 2003). Cette part significative de variabilité d'origine génétique permet d'envisager de sélectionner les bovins sur leur aptitude à produire une viande de bonne qualité. Toutefois, cela n'est pas possible en pratique en raison de l'absence de méthodes simples, rapides, et peu onéreuses, que ce soit directement sur le produit fini (la viande) ou la matière première de départ (le muscle). C'est pourquoi, les généticiens envisagent de sélectionner les animaux sur des gènes qui, par leurs polymorphismes, affectent la qualité de la viande (revue de Renand *et al.*, 2003). Le problème est d'identifier ces gènes, ceux qui seront polymorphes seront alors potentiellement utilisables en sélection génétique.

Si la part d'origine génétique est de l'ordre de 20-25 %, cela laisse supposer que l'ensemble des autres facteurs (le mode de conduite, l'alimentation, les conditions d'abattage, les procédés de transformation...), et surtout le type de muscle (morceaux à griller, à rôtir ou à bouillir), expliquent au plus 75 % de la variabilité de la qualité de la viande bovine.

Une meilleure connaissance de la biologie musculaire est absolument nécessaire pour identifier de nouvelles caractéristiques musculaires qui permettraient d'expliquer une part plus importante de la variabilité de la qualité de la viande, encore imparfaitement inconnue, notamment les différences dues au type de muscle. Par l'identification de nouveaux gènes prédicteurs de la qualité de la viande, la génomique va fortement contribuer à expliquer la variabilité actuellement non maîtrisée de la qualité de la viande bovine.

2.2. APPORTS POTENTIELS DE LA GENOMIQUE

La première application de la génomique est la découverte de nouveaux marqueurs moléculaires de la qualité de la viande. Les puces à ADN ou l'étude du protéome permettent en effet d'identifier de nouveaux gènes ou de nouvelles protéines différenciellement exprimés entre muscles conduisant à des viandes de qualité différente. Ceci est possible à condition d'utiliser une puce à ADN comportant un très grand nombre de gènes y compris ceux dont la fonction biologique est encore inconnue. Cette étape de criblage à grande échelle conduit donc à une meilleure connaissance de la biologie musculaire en relation avec la qualité des viandes.

Les gènes ainsi identifiés ouvrent de nouvelles pistes de recherche. Ils peuvent notamment être étudiés par les généticiens pour la recherche de polymorphismes associés à la variabilité de la qualité de la viande. Pour le physiologiste, ces nouveaux marqueurs s'ajoutent à ceux déjà connus (comme les chaînes lourdes de myosine, les isoformes de collagène, ...) pour mieux expliquer la variabilité de la qualité de la viande à partir de la biologie du muscle.

Néanmoins, l'étude de la biologie musculaire des gros mammifères par la génomique comportent un certain nombre de difficultés. Tout d'abord, le muscle est un tissu hétérogène comprenant plusieurs populations cellulaires (des fibres musculaires mais aussi des adipocytes intramusculaires par exemple). Il convient de développer des études plus fines pour préciser dans quelle population cellulaire sont exprimés les gènes d'intérêt nouvellement découverts. De plus, la vérification de l'importance physiologique de tel ou tel gène est, bien entendu, plus difficile chez les bovins que chez les eucaryotes ou les animaux modèles de laboratoire tels que les rongeurs (revue de Hampson et Hughes, 2001).

La deuxième application, plus futuriste mais plus appliquée, consiste à préparer un outil de diagnostic des qualités de la viande bovine utilisable en routine. En effet, dans l'état actuel des choses, le développement à l'échelle industrielle d'outils biochimiques ou physiologiques pour déterminer les caractéristiques musculaires comporte de fortes limitations techniques. Ceci conduit à envisager d'exploiter les techniques automatisées à grande échelle de la génomique. En pratique, cela revient à construire, par exemple, une "puce à ADN" avec les gènes indicateurs des caractéristiques des fibres, des collagènes et du métabolisme des lipides dans le muscle, facteurs déjà connus comme importants pour la qualité. Il est en effet envisageable de concevoir une "puce à ADN" voire une "puce à anticorps" (Taussig et Landegren, 2003) avec un nombre restreints de marqueurs très informatifs sur la qualité de la viande bovine. Avant de concevoir de tels outils, il convient donc de sélectionner avec pertinence les marqueurs moléculaires les plus informatifs. Le principal avantage de cette approche serait la possibilité de l'appliquer à différents muscles.

Un animal dont les muscles auraient un profil particulier d'expression de gènes serait capable potentiellement de produire une viande de qualité prévisible. La "carte d'identité" du muscle basée sur la "signature" d'expression de ses gènes ou de ses protéines permettrait donc de prédire la qualité de la viande issue de ce muscle.

De plus, la "signature d'expression" des gènes ou des protéines dans le muscle pourrait éventuellement être utilisée comme un outil de traçabilité du mode de conduite dans la mesure où l'expression des gènes dépend en partie de facteurs environnementaux tels que la conduite alimentaire. Dans le cadre de cette démarche, l'Equipe Croissance et Métabolismes du Muscle de l'Unité de Recherches sur les Herbivores de l'INRA développe depuis 1999 une double approche d'étude du transcriptome et du protéome, notamment dans le cadre du programme AGENAE (Analyse du Génome des Animaux d'Élevage) en collaboration avec des partenaires privés (sociétés de Biotechnologie) et différents laboratoires INRA (Station de Recherche sur la Viande et Plate-Forme Protéomique de Theix, Unité de Génétique Moléculaire de Limoges, Station de Génétique Quantitative Appliquée, Unité de Génomique et Physiologie de la Lactation et Centre de Ressources Biologiques de Jouy-en-Josas).

2.3. ANALYSE DU TRANSCRIPTOME MUSCULAIRE BOVIN

Notre objectif est de maîtriser la construction de la qualité tout au long de la vie de l'animal de sa conception à l'abattage. Pour cela, nous avons tout d'abord développé l'étude du transcriptome.

Le transcriptome a été étudié dans le cadre de deux expérimentations portant sur : (i) la mise en place des caractéristiques du muscle au cours de son développement fœtal et postnatal, (ii) les effets sur les caractéristiques musculaires d'une sélection génétique sur le potentiel de croissance musculaire.

Pour les deux modèles, nous avons analysé le transcriptome de deux muscles à griller : le *rectus abdominis* (RA), plutôt oxydatif, correspondant à la bavette de flanchet et le *semitendinosus* (ST), plutôt glycolytique correspondant au rond de gîte.

L'analyse du transcriptome consiste à repérer par hybridation les ARNm présents dans un tissu sur un répertoire de fragments de gènes (ADNc). Ces ADNc doivent être préparés à l'avance et déposés avec un robot sur une membrane de nylon ou une lame de verre (Figure 2).

L'intensité de l'hybridation pour un gène donné est proportionnelle à la quantité d'ARNm de ce gène présente dans le tissu. Pour quantifier les résultats, les ARNm sont convertis en ADNc et marqués par une molécule radioactive ou fluorescente. Ce marquage permet l'utilisation de techniques d'analyse d'image pour la quantification du niveau d'hybridation (Meunier *et al.*, 2003).

Pour étudier le transcriptome du muscle de bovin, nous ne disposions pas initialement de collections d'ADNc de bovins, représentatives des gènes exprimés dans le muscle. C'est pourquoi, nous avons dans un premier temps utilisé une collection d'ADNc de muscle humain déposée sur des membranes de nylon (Piétu *et al.*, 1996). Nous avons obtenu près de 40 % des signaux d'hybridation exploitables indiquant que l'étude du transcriptome du muscle de bovin avec des gènes humains est possible. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature quelle que soit l'espèce, (revue de Hampson et Hughes, 2001). Ce pourcentage assez bas peut s'expliquer notamment par une faible expression de certains gènes dans le muscle. Les résultats dépendent aussi bien entendu de la qualité des répertoires de gènes. De plus, l'étude du transcriptome est une technologie délicate qui fait appel à des procédures complexes de biologie moléculaire, d'analyse d'image (Meunier *et al.*, 2003) et de dépouillement statistique (Hocquette *et al.*, 2003) nécessitant de ne retenir que les signaux fiables sur le plan technique.

En ce qui concerne l'étude du développement du muscle, nous avons détecté environ 110 gènes différemment exprimés entre 110, 180, 210 et 260 jours de vie fœtale et 15 mois d'âge post-natal.

C'est au cours du dernier tiers de vie fœtale et jusqu'à l'âge de 15 mois que nous avons détecté le plus de gènes différemment exprimés (Tableau 1, Sudre *et al.*, 2003b). Ce résultat est en accord avec nos connaissances actuelles de la myogenèse chez le bovin (revue de Picard *et al.*, 2002).

Ainsi par exemple, la sur-expression à 210 jours de gènes marqueurs de l'activité mitochondriale confirme des résultats biochimiques antérieurs. Le dernier tiers de la gestation correspond en effet à une différenciation importante des fibres musculaires (apparition de leurs caractéristiques contractiles et métaboliques).

Tableau 1 : Nombre de gènes détectés comme différemment exprimés au cours de la myogenèse dans les muscles *rectus abdominis* (RA) et *semitendinosus* (ST)

	Entre 110 et 180 jours de vie fœtale	Entre 180 et 210 jours de vie fœtale	Entre 210 et 260 jours de vie fœtale	Entre l'âge de 15 mois et 260 jours de vie fœtale
Dans les 2 muscles	2	5	28	47
Dans le RA	4	6	5	13
Dans le ST	7	0	59	88

Par ailleurs, même si les résultats sont comparables pour les deux muscles étudiés, le nombre de gènes différentiellement exprimés est plus important dans le ST que dans le RA notamment aux stades les plus tardifs, suggérant une cinétique de développement différente entre ces muscles (Sudre *et al.*, 2003b).

De plus, nous avons détecté des gènes ayant une fonction biologique connue mais dont le rôle dans la myogenèse du muscle de bovin n'avait pas été décrit. En cela, cette étude ouvre de nouvelles pistes de recherches. Enfin, environ un tiers des gènes différentiellement exprimés n'ont pas de fonctions biologiques connues (Sudre *et al.*, 2003b). Comme précédemment annoncé, il s'agit d'un premier pas vers l'identification de nouveaux gènes indicateurs des caractéristiques musculaires.

En ce qui concerne le modèle de croissance musculaire, plus de 30 gènes sont différentiellement exprimés dans l'un ou l'autre des muscles RA et ST entre les deux lignées de taurillons Charolais (à fort ou faible développement musculaire) sélectionnées de façon divergente par G. Renand de la SGQA (dispositif Vachotron) sur la base de leur potentiel de croissance musculaire (Sudre *et al.*, 2003a). Un résultat qui confirme la cohérence de nos travaux est l'expression plus faible du gène d'une enzyme mitochondriale (l'isocitrate déshydrogénase) dans le ST que dans le RA. En effet, les études biochimiques avaient logiquement mis en évidence une activité plus faible de cette enzyme dans le ST, muscle glycolytique, que dans le RA, muscle plutôt oxydatif.

En général, les différences d'expression entre muscles concernent des gènes des métabolismes énergétique ou protéique et des gènes de l'appareil contractile (chaînes de myosine, isoformes de la troponine). En revanche, les différences entre types génétiques correspondent surtout à des protéines contractiles (titine, tropomyosine,...) ou de structure.

De manière intéressante, ces travaux ont également permis de révéler des gènes qui n'étaient pas encore connus pour être impliqués dans le développement musculaire (comme MLP pour muscle LIM protein, sarcosine, Trip10) et des gènes dont la fonction biologique reste inconnue. Le lien de ces nouvelles caractéristiques moléculaires avec la qualité de la viande reste à établir (Sudre *et al.*, 2003a).

Les travaux présentés ici sont les premières études du transcriptome du muscle de bovin disponibles dans la littérature. Ce sont donc des expérimentations originales qui apportent des résultats nouveaux. Toutefois, ces études ont été réalisées avec des fragments de gènes humains fixés sur des membranes, ce qui présente deux limites majeures : des contraintes méthodologiques et l'utilisation d'un répertoire de gènes initialement dédié à l'étude de pathologies musculaires chez l'homme.

La pertinence biologique des résultats de génomique dépend, bien entendu, de l'identité des gènes du répertoire utilisé (Figure 2). C'est pourquoi, dans un deuxième temps, un répertoire d'ADNc de muscles de bovin a été construit en collaboration avec l'Equipe de P. Martin (INRA, Jouy-en-Josas). Pour cela, une collection de gènes (ou banque d'ADNc) a été préparée à partir d'un mélange de muscles

bovins oxydatifs ou glycolytiques prélevés sur des bovins de plusieurs races françaises laitières ou à viande qui ont été abattus à différents âges fœtaux ou post-nataux. Cette banque d'ADNc est donc tout à fait originale, non seulement par sa spécificité tissulaire, mais aussi parce qu'elle a été préparée à partir d'échantillons de muscles aux caractéristiques variées. Plus de 1000 fragments de gènes étudiés ont permis d'obtenir des informations exploitables. Ces gènes appartiennent à plusieurs grandes familles de protéines (métabolisme énergétique, appareil contractile, etc. Le traitement des informations relatives à ces gènes a nécessité un travail important de bio-informatique réalisé par l'Equipe de SIGENA (Système d'Information d'AGENAE). Des fragments de gènes (ADNc) issus de cette collection ont été sélectionnés sur la base de critères de qualité et en fonction de leurs fonctions biologiques.

Ce répertoire a été complété avec des fragments de gènes connus et étudiés pour leur implication dans le déterminisme de la qualité de la viande. Ces gènes ont été amplifiés par RT-PCR avec des amorces spécifiques. L'enrichissement du répertoire par des ADNc correspondant à des gènes d'intérêt pour la qualité de la viande en renforce sa pertinence. Ce répertoire correspond finalement à 440 gènes différents qui ont été déposés en double sur des membranes de nylon (Sudre *et al.*, 2003c).

Les premières utilisations de ce répertoire ont permis d'obtenir des résultats exploitables. Les gènes différentiellement exprimés confirment qu'une sélection en faveur du potentiel de croissance musculaire s'accompagne d'un renforcement des caractéristiques musculaires rapides glycolytiques aux dépens des caractéristiques lentes oxydatives (Listrat *et al.*, 2003), confirmant ainsi des résultats biochimiques préalables (Sudre *et al.*, 2003a).

2.4. ANALYSE DU PROTEOME MUSCULAIRE BOVIN

L'analyse du protéome consiste à extraire les protéines musculaires et à les séparer par électrophorèse bidimensionnelle. Les protéines sont tout d'abord séparées en fonction de leur point isoélectrique (pH où la charge de la protéine est nulle) puis selon leur taille. Les protéines sont ensuite colorées et quantifiées par un système d'analyse d'images. Les protéines d'intérêt sont découpées, extraites du gel et identifiées par spectrométrie de masse puis à l'aide d'outils de bio-informatique.

Nous avons tout d'abord optimisé les techniques d'électrophorèse bidimensionnelle. Dans nos conditions, nous pouvons révéler dans le muscle *semitendinosus* (ST) environ 500 protéines bien séparées après coloration des gels au bleu colloïdal. Ces protéines ont une masse comprise entre 8 et 200 kDa. Nous avons pu ainsi établir une carte d'une centaine de protéines du muscle ST bovin (Bouley *et al.*, 2003a). Cette carte, qui sera complétée progressivement, servira de support pour l'étude du protéome du muscle de bovin dans le cadre de différentes problématiques (développement musculaire, qualité de la viande). L'analyse des gels indique que les variations quantitatives et qualitatives des protéines du muscle ne concernent qu'une très faible proportion d'entre elles (inférieure à 10 %).

Une première étude récente a mis en évidence une sur-expression d'une forme de la protéine "heat shock" (Hsp27) et de certaines isoformes rapides de la troponine T ainsi qu'une sous-expression des isoformes lentes de la troponine T squelettique dans le muscle de bovin présentant une hypertrophie musculaire (Bouley *et al.*, 2003b). L'expression différentielle des isoformes de troponine T est cohérente avec une proportion plus élevée de fibres rapides glycolytiques. La sur-expression d'une forme de Hsp27 pourrait être associée à des modifications de l'organisation de l'actine, qui est une des protéines majeures du muscle. Enfin, sur l'ensemble des protéines concernées par une variation d'expression, plusieurs sont retrouvées dans différents modèles d'hypertrophie musculaire (culards et lignées divergentes à fort développement musculaire). D'autres protéines différentiellement exprimées sont en cours d'identification. Ainsi, ces protéines sont des marqueurs possibles d'un fort potentiel de croissance musculaire.

Une seconde étude a porté sur l'analyse protéomique de muscles de taurillons charolais de 15 mois, dont le rond de gîte avait été préalablement classé dans deux catégories de tendreté, forte ou faible, sur la base de caractéristiques biochimiques. Les résultats montrent que l'enzyme triose phosphate isomérase et la forme phosphorylée de la chaîne légère de myosine sont surexprimées dans la viande de tendreté supérieure (Figure 3). En revanche, les Hsp27, l'isoforme de chaîne légère de myosine non phosphorylée (Figure 3B) ainsi qu'une protéine encore non identifiée sont sous-exprimées. Ces premiers résultats demandent à être validés et complétés. Le lien direct avec la tendreté reste à établir.

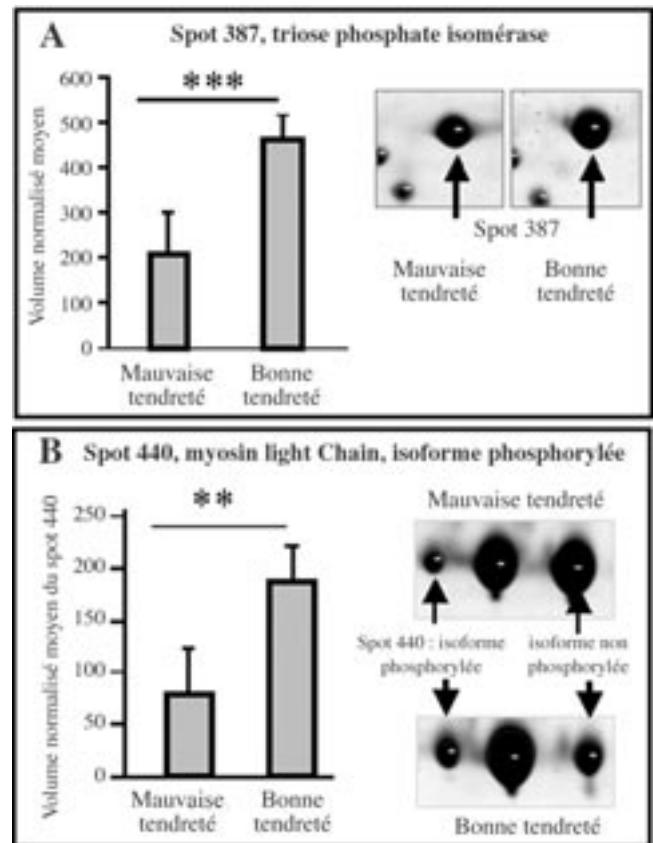
CONCLUSION

La génétique et les conditions d'élevage déterminent ensemble et en interaction les caractéristiques des animaux et de la viande qu'ils produisent. La génomique autorise une vision globale et exhaustive des caractéristiques des gènes (génomique structurale) et de leur niveau d'expression (génomique expressionnelle) permettant de mieux comprendre les mécanismes biologiques.

Parmi les premiers résultats obtenus à ce jour, les données biochimiques ou génomiques convergent vers l'idée que les bovins à fort potentiel de croissance musculaire ont des muscles plus rapides et plus glycolytiques. La régulation des nouveaux indicateurs issus des approches de génomique est en effet comparable à celle des caractéristiques musculaires déjà connues.

Grâce au développement des techniques puissantes de génomique, la filière aura probablement accès, dans le futur, à des outils permettant de déterminer de façon automatisée et reproductible le niveau d'expression des gènes ou de leurs protéines permettant ainsi de mieux caractériser les phénotypes. L'objectif à long terme est d'exploiter la variabilité des caractères intra-race et entre races afin de construire une "puce à ADN" ou une "puce à anticorps" avec

Figure 3 : Protéines surexprimées dans le muscle *semitendinosus* de bonne tendreté



les gènes ou les protéines les plus informatifs qui seront issus de nos études. En d'autres termes, les expérimentations en cours permettront de retenir un nombre plus réduit de "prédicteurs" des caractéristiques des muscles et des viandes qui sont différents entre animaux et entre races.

Les principales applications potentielles qui ont été décrites par Eggen et Hocquette (2003) sont :

- (i) la mise en évidence de nouvelles caractéristiques musculaires explicatives de la variabilité de la qualité de la viande,
- (ii) l'identification de niveaux d'expression de gènes caractéristiques des différents muscles ou associés aux différentes conduites d'élevage (vitesse de croissance, mode de conduite, niveau et type d'alimentation),
- (iii) l'identification de gènes polymorphes ayant une forte influence sur la qualité finale du produit et pouvant être utilisés en sélection génétique des animaux producteurs de viande.

La filière dans son ensemble doit comprendre l'intérêt des nouvelles techniques de génomique, et se les approprier pour participer pleinement au développement des outils qui lui seront utiles.

Les auteurs remercient tous les membres de l'équipe *Croissance et Métabolismes du Muscle pour leur participation à ces analyses, ainsi que K. Sudre, J. Bouley, Y. Ueda, I. Barnola, C. Bernard et S. Viala qui ont contribué, au cours de leur passage au laboratoire, aux études de génomique fonctionnelle. Les auteurs remercient également leurs collègues de Jouy-en-Josas (P. Martin, G. Roland, G. Renand), de Theix (C. Leroux) ou de Limoges (H. Levéziel), qui ont considérablement contribué à l'avancée des études en génomique bovine à l'INRA.*

Bertrand, J.K., Green, R.D., Herring, W.O., Moser, D.W. 2001. J. Anim. Sci., 79, E190-E200.
Bouley, J., Chambon, C., Picard, B. 2003a. Renc. Rech. Ruminants, 10.
Bouley, J., Chambon, C., Picard, B. 2003b. Sci. Alim., 23, 75-79.
Burrow, H.M., Moore, S.S., Johnston, D.J., Barendse, W., Bindon, B.M. 2001. Aust. J. Exp. Agr., 41, 893-919.
Culioli, J. 1999. Bull. Acad. Vét. de France, 72, 25-46.
Dransfield, E., Martin, J.F., Bauchart, D., Abouelkaram, S., Lepetit, J., Culioli, J., Jurie, C., Picard, B. 2003. Anim. Sci., 76, 387-399.
Dufour, E., Frencia, J.P. 2001. Viandes Prod. Carnés, 22, 9-14.
Eggen, A., Hocquette, J.F. 2003. Meat Sci., 66, 1-9.
Geay, Y., Bauchart, D., Hocquette, J.F., Culioli, J., 2002. INRA Prod. Anim., 15, 37-52.
Geay, Y., Renand, G. 1994. Renc. Rech. Ruminants, 1, 177-182

Hampson, R., Hughes, S.M. 2001. Gen. Biol. 2, 1033.1-1033.3.
Hocquette, J.F., Barnola, I., Bernard, C., Meunier, B., Sudre, K., Listrat, A., Cassar-Malek, I., 2003. Renc. Rech. Ruminants, 10.
Hatey, F., 2000. INRA Prod. Anim. Hors Série, 153-160.
Listrat, A., Sudre, K., Leroux, C., Cassar-Malek, I., Gentès, G., Hocquette, J.F. 2003. Renc. Rech. Ruminants, 10.
Meunier, B., Sudre, K., Cassar-Malek, I., Listrat, A., Hocquette, J.F. 2003. Renc. Rech. Ruminants 10.
Noonan, A.S. 2002. Genet. Med., 4, 72S-76S.
Picard, B., Lefaucheur, L., Berri, C., Duclos M., 2002. Reprod. Nutr. Dev., 42, 415-431.
Piétu, G., Alibert, O., Guichard, V., Lamy, B., Bois, F., Leroy, E., Mariage-Samson, R., Houllatte, R., Soularue, P., Auffray, C. 1996. Genome Res., 6, 492-503.
Renand, G., Larzul, C., Le Bihan-Duval, E., Le Roy, P. 2003. INRA Prod. Anim., 16, 159-173.
Sudre, K., Cassar-Malek, I., Leroux, C., Listrat, A., Ueda, Y., Jurie, C., Renand, G., Martin, P., Hocquette, J.F. 2003a. Sci. Alim., 23, 65-69.
Sudre, K., Leroux, C., Piétu, G., Cassar-Malek, I., Petit, E., Listrat, A., Auffray, C., Picard, B., Martin, P., Hocquette, J.F. 2003b. J. Biochem., 133, 745-756.
Sudre, K., Rolland, G., Leroux, C., Listrat, I., Cassar-Malek, I., Meunier, B., Martin, P., Hocquette J.F. 2003c. Book of Abstracts of the 54th Annual Meeting of European Association for Animal production, Rome (Italie) August 31st-September 3rd 2003, 9, 248.
Taussig, M.J. Landegren, U. 2003. TARGETS 2, 169-176.

Glossaire :

ADN (Acide DésoxyriboNucléique) : support moléculaire de l'information génétique.

Gène : segment d'ADN permettant la synthèse d'une protéine.

ARN (Acide RiboNucléique) messenger ou transcrit : molécule permettant le transfert de l'information génétique de l'ADN à la protéine.

ADNc (complémentaire) : copie complémentaire d'un ARNm produite en laboratoire pour une analyse plus aisée de l'information génétique.

Hybridation : liaison entre molécules d'ADN ou entre molécules d'ADN et d'ARN. L'hybridation permet, par exemple, de détecter des molécules d'ARN ou d'ADN dans une cellule et de déterminer la quantité d'ARNm d'un gène exprimé.

Protéines : molécules constituées d'acides aminés assurant différentes fonctions biologiques. Les protéines sont la résultante de l'information génétique contenue dans les gènes.

Génomique : biotechnologie visant l'étude à grande échelle de la structure et de la fonction des gènes.

Transcriptomique : étude simultanée (à grande échelle) d'un grand nombre de transcrits.

Protéomique : étude simultanée (à grande échelle) d'un grand nombre de protéines.