

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE THEMATIQUE : BIOLOGIE, SANTE

FACULTE des Sciences et Techniques

Unité de Génétique Moléculaire Animale

UMR 1061 INRA/Université de Limoges

Thèse n°

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie, Sciences, Santé

Présentée par :

Xavier BLANCHET

Des gènes impliqués dans la variabilité de la tendreté des viandes bovines

Etude structure-fonction de l'anti-protéase codée par le gène bovin SERPINA3-3

Directeurs de thèse : Dr Laure BREMAUD et Dr Hubert LEVEZIEL

Jury :

Rapporteurs : **M. Yves BENYAMIN**, Professeur, Ecole Pratique des Hautes Etudes, Montpellier
M. Hervé REMIGNON, Professeur, INPT-ENSAT, Toulouse

Examineurs : **M. Ahmed OUALI**, Directeur de Recherche INRA, Theix/Clermont-Ferrand
M. Hubert LEVEZIEL, Directeur de Recherche INRA, Limoges
Mme Laure BREMAUD, Maître de Conférences, Université de Limoges
M. Abderrahman MAFTAH, Professeur, Université de Limoges

Invitée : **Mme Carine CAPEL**, Chef de projet, Institut de l'Elevage

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE THEMATIQUE : BIOLOGIE, SANTE

FACULTE des Sciences et Techniques

Unité de Génétique Moléculaire Animale

UMR 1061 INRA/Université de Limoges

Thèse n°

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie, Sciences, Santé

Présentée par :

Xavier BLANCHET

Des gènes impliqués dans la variabilité de la tendreté des viandes bovines

Etude structure-fonction de l'anti-protéase codée par le gène bovin SERPINA3-3

Directeurs de thèse : Dr Laure BREMAUD et Dr Hubert LEVEZIEL

Jury :

Rapporteurs : **M. Yves BENYAMIN**, Professeur, Ecole Pratique des Hautes Etudes, Montpellier
M. Hervé REMIGNON, Professeur, INPT-ENSAT, Toulouse

Examineurs : **M. Ahmed OUALI**, Directeur de Recherche INRA, Theix/Clermont-Ferrand
M. Hubert LEVEZIEL, Directeur de Recherche INRA, Limoges
Mme Laure BREMAUD, Maître de Conférences, Université de Limoges
M. Abderrahman MAFTAH, Professeur, Université de Limoges

Invitée : **Mme Carine CAPEL**, Chef de projet, Institut de l'Elevage

Résumé

Ma thèse fut orientée selon trois axes. Le premier a consisté en une étude bibliographique des données existantes sur les paramètres génétiques liés à la tendreté des viandes bovines. Ces recherches m'ont permis de formuler un scénario hypothétique expliquant la chronologie des événements pouvant se mettre en place après la mort de l'animal et dans lequel les inhibiteurs protéasiques ainsi que la mitochondrie joueraient un rôle tout particulier. Le deuxième volet concernait l'étude de la relation « structure-fonction » de la protéine bovSERPINA3-3, un inhibiteur de protéase à sérine. Cette étude a permis de mettre en évidence l'importance du résidu D371 dans l'inhibition de la caspase 3, protéase à cystéine impliquée dans le phénomène apoptotique qui surviendrait juste après la mort de l'animal. Elle conforte ainsi le rôle des serpinines dans la maturation de la viande. De plus, ce résidu semble également impliqué dans le phénomène de dimérisation de cette protéine observé en conditions dénaturantes. Le modèle structural que nous proposons pourrait permettre de mieux appréhender le phénomène de polymérisation des serpinines humaines responsables de pathologies telles que l'emphysème, la cirrhose ou encore la maladie d'Alzheimer. La troisième partie de ma thèse a été consacrée à la mise au point d'un test ELISA, utilisant l'anti-protéase recombinante comme protéine référente de la gamme d'étalonnage. L'utilisation de ce test devrait permettre de quantifier le taux de serpinines bovines dans des échantillons d'intérêt mais également dans des études spatio-temporelles à différents stades de développement et dans différents tissus ou organes.

Mots-clés : serpine, tendreté, muscle *post-mortem*, apoptose, dimérisation.

Abstract

My thesis was declined in three fields of research. First, a bibliographical study was conducted on the data available about genetic parameters of beef tenderness. This research allowed me to develop a scenario which would explain the chronology of the events occurring after animal death by which protease inhibitors and the mitochondrion seem to play a paramount role. The second research was carried out on structure function relationship of a bovine serine protease inhibitor (serpin), bovSERPINA3-3. This study has shown the significance of the amino acid D371 in the cross-class inhibition mechanism against a cysteine protease, caspase 3, involved in apoptosis, a mechanism which would occur after the death of the animal. This study confirms serpins importance during meat ageing. Moreover, it underlined the necessity of this residue for the dimerization of bovSERPINA3-3 under denaturing conditions. This situation could be used as a model for the human serpins polymerization phenomenon found in some diseases such as Alzheimer's, cirrhosis or emphysema. Finally, the last point was related to the development and validation of an ELISA test, using the bacterial recombinant bovSERPINA3-3 as reference. This test will allow to quantify the bovine serpinA3s rate in samples of interest and to carry out a spatio-temporal study of the bovine serpinA3s at different developmental stages and organs or tissues.

Keywords: serpin, tenderness, *post-mortem* muscle, apoptosis, dimerization.

Remerciements

Il est difficile pour moi (car je ne suis pas très doué pour cela) de trouver les mots justes pour remercier toutes les personnes qui ont traversé ma vie durant ces dernières années car comme certains disent : une pensée vaut plus que mille mots... Bon allez je me lance !

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté et pris le temps de juger mon travail. Les deux rapporteurs, MM. Yves BÉNYAMIN et Hervé RÉMIGNON ; Mme Carine CAPEL et l'Institut de l'Élevage pour avoir financé cette thèse ; M. Abderrahman MAFTAH d'avoir accepté d'être président de mon jury de thèse, M. Hubert Levéziel pour m'avoir accueilli au laboratoire et accepté d'être mon co-directeur de thèse. Je remercie également Gilles Renand et Bertrand Liagre d'avoir été membres de mon comité de thèse.

Je remercie aussi chaleureusement Ahmed Ouali pour son accueil, son aide et son soutien lors de mes séjours au centre INRA de Theix/Clermont-ferrand (et ça n'a pas toujours été facile !). J'y ai rencontré de nombreuses personnes formidables. Je pense notamment à Yvette, Gérard (Madidina !), Laurent (aussi cynique que Dr House !), Nathalie M. (Loïc et sa petite pitchounette de sœur), Éléonore, les stagiaires (Niels et Delphine) et enfin Samira sans qui beaucoup de manip (si ce n'est toutes) n'aurait pu être accomplies et à qui je dois beaucoup (shoukran !).

Je remercie la société GLYCODE notamment Christelle et Ludivine d'avoir produit la serpine recombinante chez la levure. C'était une tâche ardue mais elles y sont tout de même arrivées.

Ensuite, les gens du labo et autour. Il serait incorrect de ma part de remercier tout le monde de façon groupée car certains ont fait plus que d'autres pour moi et qui me marqueront... ou pas, ce qui risque au final de faire catalogue mais tant pis.

Tout d'abord les secrétaires, Madeleine et sa (toute jeune) remplaçante Débora qui m'ont sorti du pétrin à de nombreuses reprises, Isaura qui est peut être la personne la plus courageuse et la plus travailleuse que je connaisse (rien ne l'arrête pas même les problèmes de santé, respect).

Ensuite les « proteomic girls » Karine et Emilie, qui m'ont filé quelques coups de main non négligeables et à qui j'ai prêté main forte en retour (enfin je crois ?). Il y a bien sûr Lionel et ses séquences (un jour j'arriverai à faire du 100% !), Véronique et Laëtitia pour leur bonne humeur et François pour son rire communicatif et son enthousiasme.

Ensuite il y a Ahmad et ses horaires décalés, Lamia (Salam !) et sa gentillesse, Sylvia-Warhammer-40K, Almine, le jeune thésard à qui je souhaite bon courage (et surtout bonne chance !) et Assunta aka Miss Italy (vai vai vai), Mme Anne (avec son infernale tu-me-fais-un-bisou-NON !-Rebecca, Maya-je-suis-calme-comme-l'eau-du-lac et Stéphane) qui m'a donné de précieux conseils pour mon manuscrit, Agnès pour sa gentillesse et qui m'a beaucoup aidé pour la partie de phylogénie (au fait Agnès j'ai fermé derrière et tu es la dernière), Fabrice (« bonjour jeune Fabrice ») pour sa bonne humeur et ses conseils.

Un merci à Aurélien (et Fanny) et Renaud qui m'ont dépanné quand j'étais en galère ainsi qu'à Olivier C. qui m'a servi de chauffeur quelques fois.

Enfin, je garde le meilleur pour la fin. Tout d'abord les gens du « 4/5 », Mathilde (et Matthieu) jamais défaitiste toujours positif et super sympa avec moi, Sébastien, Ousmane (c'est lui le seul fan du PSG !?!), Aurélie (et son rire) pour leur bonne humeur et joie de vivre. Ensuite, vas-y-exprime-toi-miss Katy, bon courage à toi aussi (faut rien lâcher !), Caroline toute fraîche stagiaire de MII (quelle idée bizarre de se

lancer dans cette galère, ah la jeunesse insouciant...), Mélanie (j'espère que mon hébergement de fortune t'a plu), Olivier M. (et M. Maxime) qui parle peu mais qui peut être d'un cynisme remarquable, Marie-Clémence alias MCC alias miss 1200 qui est la seule à rire à toutes mes blagues (comment ça elles sont malsaines), et rien que pour cela ça vaut beaucoup. Enfin, Nathalie (et son mari Nicolas-Bienvenu-à-Zombieland-quel-pied !) qui donne de sacrés coups de pouce à l'équipe, apportant une touche de féminité et de bonne humeur mais qui ne peut résister à l'appel implacable du Michoço® (ma méthode de corruption) et Antoine, mon collègue de bureau et de labo, les sacrés délires que l'on s'est tapés avec Nathalie (surtout avec mes histoires « drôles »).

Je tiens aussi à remercier les sportifs (je déteste le sport) Benoît, d'avoir été mon chauffeur (et j'ai des épisodes de Bones pour toi ; par contre Radiohead ras-la-casquette !), Aymeric, qui m'a le plus véhiculé je pense (j'aurais dû prendre un abonnement !) et qui m'a fait redécouvrir les joies des jeux vidéos (ah Resident Evil...) et Valy (je gère tes parents quand tu veux).

Toutes ces personnes ont été obligées de me supporter, de me subir... TOTAL FUCKING RESPECT!!!

Je voudrais également remercier ma famille, Sonia, Maire-Lise, Anne-Claire, Aurélie, Marie-Laure, Cécile, les Emilies, Chris (allez l'OM !), Pavlina, Tamara, Caroline, Rosalie et sa mère, Maude, Mickaël, Abdul (my friend !), Elodie, Betty, mon podologue et mon chausseur parce que j'en ai fait des kilomètres à pied (comment ça mes chaussures grincent ?) et bien d'autres encore que j'ai sûrement oublié...désolé.

Pour finir, je veux remercier Laure, Patrick et Didier. Il m'est difficilement possible de coucher des mots pour exprimer toute ma gratitude et ma reconnaissance, pour tout ce que vous avez accompli, tout ce que vous m'avez enseigné, toutes les galères que vous avez dû gérer par ma faute, tellement de choses qu'en faire la liste serait inimaginable... Seulement un seul mot pourrait qualifier tout cela : MERCI !!! (Quoi ? Non on ne va quand même pas se mettre à pleurer...)

Une dernière chose : je te remercie Charlie Hebdo pour les bons moments que tu me fais passer chaque semaine, et MUSIQUE, ma MUSIQUE, celle que j'écoute et que les gens qualifient de bruit (et pourtant ce n'est pas que cela). Elle m'a permis de me maintenir à flot, les émotions qu'elle m'a communiquées sont indescriptibles mais elles étaient en phase avec mon humeur du moment.

LISTE DES ABREVIATIONS

ΔG : enthalpie libre	eQTL : expression Quantitative Trait Loci
ACAD : Acyl-Coenzyme A deshydrogénase	EST : Expressed Sequence Tag
ADN : Acide DesoxyriboNucléique	FAD : Flavine Adenine Dinucléotide oxydée
ADNc : Acide DesoxyriboNucléique complémentaire	FADH₂ : Flavine Adenine Dinucléotide réduite
ADP : Adenosine DiPhosphate,	FENIB : Familial Encephalopathy with Neuroserpin Inclusion Bodies
ADCY2 : Adenylate cyclase 2	G6PT1 : Glucose-6-phosphate translocase 1
AFXa : Anticoagulant Factor Xa	GDF8 : Growth Differentiation Factor 8
Apaf : Apoptotic protease activating factor	GH : Growth Hormone
AMC : Amido 4-methylcoumarine	GPD1 : Glycerol Phosphate Dehydrogenase 1
ARN : Acide ribonucléique,	HGD : Homogentisate 1,2-dioxygénase
ARNm : Acide RiboNucléique messenger	Hinf : <i>Haemophilus influenzae</i>
ASC : Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD	HSP : Heat Shock Protein
ATP : Adenosine TriPhosphate	IAP : Inhibitor of Apoptosis Protein
ATIII : Antithrombine III	ICE : Interleukin 1 β -Converting Enzyme
Bcl-2 : B-cell lymphoma-2	LD : <i>longissimus dorsi</i>
BIR : Baculovirus IAP Repeat	LEP : LEptin
BTA : chromosome de <i>Bos taurus</i>	LINE : Long Interspersed Nuclear Element
CALCA : Calcitonine	LM : <i>longissimus muscle</i>
CAPN : Calcium-Activated Proteases Neutral	LOX : Lysyl oxydase
CARD : CASpase-Recruitment Domain	LT : <i>longissimus thoracis</i>
CAST : Calpastatin	MEC : Matrice Extra-Cellulaire
CBG : Cortisol-Binding Globulin	MMP : Matrix MetalloProteinase
cM : centiMorgan	MT-MMP : Membrane-Type MMP
CoA : Coenzyme A	MYOD1 : MYOgenic Determination factor 1
Da : Dalton	NAD(P) : Nicotinamide Adenine Dinucléotide (Phosphate) oxydée
DD : Death Domain	NAD(P)H : Nicotinamide Adenine Dinucléotide (Phosphate) réduite
DED : Death Effector Domain	NCBI : National Center for Biotechnology Information
DISC : Death- Inducing Signaling Complex	NLR : Nucleotide-binding and oligomerization domain Leucine-rich Repeat
DNAJA1 : DnaJ homolog subfamily A member 1	PAGE : PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
EDTA : EthyleneDiamineTetracetic Acid	
EGTA : EthyleneGlycolTetraacetic Acid	

PAI : Plasminogen Activated Inhibitor

PBS : Phosphate Buffer Saline

PCR : Polymerisation Chain Reaction

PDB : Protein DataBase

PNGase : Peptide-N-Glycosidase

PMAIP : Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein

PMSF : PhenylMethylSulfonyl Fluoride

pQTL : protein Quantitative Trait Loci

PUMA : p53 Upregulated Modulator of Apoptosis

QTL : Quantitative Trait Loci

RCL : Reactive Center Loop

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

ROS : Reactive Oxygen Species

S : Svedberg

SCCA1 : Squamous Cell Carcinoma Antigen 1

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SERCA : Sarco/Endoplasmic-Reticulum Calcium ATPase 1

Serpin : Serine protease inhibitor

SM : *semimembranosus*

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

ST : *semitendinosus*

TB : *triceps brachii*

TBG : Thyroxin-Binding Globulin

TCP : T Complex Polypeptide

TIMP : Tissue Inhibitor of MetalloProteinases

Trx : Thioredoxine

UTR : UnTranslated Region

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES LISTE DES TABLEAUX

AVANT-PROPOS	1
EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE	3
I. Qu'est-ce que la tendreté ?	7
I.1 Définition de la tendreté	7
I.2 Mesure de la tendreté	8
II. Transformation du muscle en viande	9
II.1 La phase d'installation de la rigidité cadavérique	9
II.2 La phase de maturation	10
III. Les causes de variabilité de la tendreté	11
III.1 Facteurs maîtrisés par l'Homme	11
III.1.1 <i>La température</i>	11
III.1.2 <i>La stimulation électrique</i>	12
III.1.3 <i>L'accrochage des carcasses</i>	12
III.1.4 <i>La cuisson</i>	13
III.1.5 <i>Le régime alimentaire</i>	13
III.2 Facteurs liés à l'animal	15
III.2.1 <i>Le comportement des animaux</i>	15
III.2.2 <i>Le sexe des animaux</i>	15
III.2.3 <i>Variation inter- et intra-races et inter-espèces</i>	16
III.3 Facteurs physico-chimiques et biologiques	17
III.3.1 <i>Le pH</i>	17
III.3.2 <i>Le pouvoir tampon</i>	18
III.3.3 <i>Le tissu conjonctif</i>	18
III.3.4 <i>Variation intra- et inter-musculaires</i>	20
III.3.5 <i>Le type de fibres</i>	20
IV. Déterminisme génétique de la tendreté	22
IV.1 QTL et tendreté	29
IV.2 QTL et banques de données	30
– Chromosome bovin 2	30
– Chromosome bovin 4	33
– Chromosome bovin 5	33
– Chromosome bovin 7	33
– Chromosome bovin 10	34
– Chromosome bovin 11	34
– Chromosome bovin 15	34
– Chromosomes bovins 18 et 19	34
– Chromosome bovin 25	35
– Chromosomes bovins 20 et 29	35
IV.3 Gènes candidats	36
– L'Acyl-Coenzyme A Deshydrogenase (ACAD), membre 8	36
– L'Homogentisate 1, 2 Dioxygenase (HGD)	37

– La Leptine	37
– L’Hormone de croissance	38
– La Myostatine	39
– La Lysyl oxidase	41
– La Calpastatine.....	41
– Les Calpaïnes	43
– L’Homologue à DnaJ (Hsp40), sous-famille A, membre 1	46
IV.4 Notions d’eQTL et de pQTL	49
V. Activités protéolytiques et modifications <i>post-mortem</i> du muscle.....	51
V.1 Les exoprotéases.....	51
<i>V.1.1 Les carboxypeptidases</i>	51
<i>V.1.2 Les aminopeptidases</i>	52
<i>V.1.3 Les dipeptidases</i>	52
<i>V.1.4 Les dipeptidylpeptidases</i>	52
V.2 Les endoprotéases.....	52
<i>V.2.1 Le protéasome</i>	53
<i>V.2.2 Les cathepsines</i>	55
<i>V.2.3 Les métalloprotéïnases</i>	61
<i>V.2.4 Les calpaïnes</i>	63
<i>V.2.5 Les protéases à sérine</i>	69
V.2.5.1 Structure et mécanisme catalytique des protéases à sérine	69
V.2.5.2 Protéases à sérine et maturation <i>post-mortem</i> du muscle.....	71
<i>V.2.6 Les caspases</i>	73
V.2.6.1 Les caspases de classe I.....	75
V.2.6.2 Les caspases de classe II	77
V.2.6.3 Les caspase de classes III	77
V.2.6.4 Les cibles des caspases.....	78
V.2.6.5 Fonction des caspases.....	78
V.2.6.6 Voies de l’apoptose	78
<i>V.2.6.6.1 Voie extrinsèque</i>	79
<i>V.2.6.6.2 Voie intrinsèque</i>	79
<i>V.2.6.6.3 Voie du Réticulum Endoplasmique (RE)</i>	81
<i>V.2.6.6.4 Voie du granzyme B</i>	82
V.2.6.7 Apoptose et modifications <i>post-mortem</i> du muscle	82
VI. Les inhibiteurs de protéases.....	85
VI.1 Les inhibiteurs du protéasome	85
VI.2 Les cystatines, inhibiteurs des cathepsines.....	86
VI.3 Les inhibiteurs endogènes des métalloprotéïnases	87
VI.4 La calpastatine, inhibiteur des calpaïnes.....	89
VI.5 Les inhibiteurs de caspases	92
<i>VI.5.1 Les IAPs, pour Inhibitors of Apoptosis Proteins</i>	92
<i>VI.5.2 Les autres inhibiteurs des caspases</i>	92
VII. Les inhibiteurs de protéases à sérine	95
VII.1 Classification.....	95
VII.2 Les serpins	95
VII.3 Fonctions biologiques des serpins	97
VII.4 Structure des serpins.....	97
VII.5 Mécanisme d’inhibition des serpins	101
VII.6 Inhibition croisée ou « cross-class inhibition » et inhibition réversible.....	103
VII.7 Autres mécanismes d’inhibition des serpins	103

VII.8 Maladies associées aux serpins	104
VII.9 Implication des serpins musculaires dans la tendreté de la viande	109
RESULTATS-DISCUSSION	111
Partie I : Clonage et séquençage du gène et de l'ADNc codant bovSERPINA3-3	113
I.1 La famille multi-génique <i>bovSERPINA3</i>	133
I.2 Le gène <i>bovSERPINA3-3</i> et son ADN complémentaire	133
I.3 Conclusion et résultats complémentaires	135
Partie II : Etude des relations structure-fonction de la protéine bovSERPINA3-3	141
II.1 Activités anti-trypsique et anti-caspase 3 de bovSERPINA3-3 recombinante	141
<i>II.1.1 Production de la protéine bovSERPINA3-3 recombinante sauvage</i>	<i>141</i>
II.1.1.1 Choix du système de production	141
II.1.1.2 Choix du vecteur	143
II.1.1.3 Purification de la protéine recombinante bovSERPINA3-3	143
<i>II.1.2 Mesure des activités inhibitrices</i>	<i>145</i>
II.1.2.1 Mécanisme d'action de la trypsine et de la caspase 3	145
II.1.2.2 Mécanisme(s) d'inhibition	145
II.1.2.3 Inhibition de la trypsine et de la caspase 3 par la protéine recombinante bovSERPINA3-3	147
II.1.2.4 Identification de l'acide aminé cible de la caspase 3	149
II.1.2.5 Formation de complexes entre l'anti-protéase et les protéases à sérine	149
II.2 Phénomène de dimérisation	159
<i>II.2.1 Polymérisation et dimérisation des serpins</i>	<i>159</i>
<i>II.2.2 Dimérisation de la protéine bovSERPINA3-3</i>	<i>159</i>
II.3 Glycosylation de la protéine bovSERPINA3-3	183
<i>II.3.1 La N-glycosylation chez la levure</i>	<i>183</i>
<i>II.3.2 Production de la protéine bovSERPINA3-3 chez Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>185</i>
<i>II.3.3 Tests d'activité</i>	<i>187</i>
Partie III : Quantification des serpins A3 bovines par test ELISA	189
III.1 Pourquoi ce test ELISA ?	189
III.2 Principe et mise au point du test ELISA	191
<i>III.2.1 Etablissement de la courbe de calibration</i>	<i>191</i>
<i>III.2.2 Détermination de la limite de détection du dosage</i>	<i>193</i>
<i>III.2.3. Détermination de la répétabilité inter- et intra-essai du dosage ELISA</i>	<i>193</i>
<i>III.2.4 Détermination du pourcentage de récupération</i>	<i>194</i>
Partie IV : La transformation du muscle en viande : de l'abattage de l'animal à la phase de <i>rigor mortis</i>	195
CONCLUSION	203
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	209

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Profil d'évolution de la dureté du muscle au cours de la conservation	9
Figure 2 : Structure du protéasome 20S.....	54
Figure 3 : La métalloprotéinase MMP-12 du macrophage humain	62
Figure 4 : Les calpaïnes	64
Figure 5 : Les acides aminés de la triade catalytique de la chymotrypsine bovine	70
Figure 6 : Représentation schématique du mécanisme d'action des protéases à sérine	71
Figure 7 : Représentation schématique d'une procaspase de mammifère	72
Figure 8 : Représentation schématique et tridimensionnelle de la caspase 3.....	72
Figure 9 : Les caspases chez les mammifères	74
Figure 10 : Schéma de l'inflammasome.....	74
Figure 11 : Les complexes protéiques responsables de l'activation des caspases initiatrices	76
Figure 12 : Représentation schématique des différentes voies de l'apoptose	80
Figure 13 : Inhibition de la thréonine du site actif du protéasome par le MG132	85
Figure 14 : Structure du complexe MMP-13 et TIMP-2	87
Figure 15 : La calpastatine bovine.....	88
Figure 16 : Représentation tridimensionnelle du complexe m-calpaïne/calpastatine	90
Figure 17 : Rôles biologiques des serpins	96
Figure 18 : Représentation tridimensionnelle d'une serpine native	96
Figure 19 : Représentation structurale des conformations δ , latente, clivée et polymérique.	96
Figure 20 : Représentation schématique de l'équilibre dynamique de la thyroglobuline s'opérant entre la liaison et la libération de la thyroxine.....	98
Figure 21 : Mécanisme d'action des serpines transporteuses d'hormones CBG et TBG.	98
Figure 22 : Représentation schématique du complexe serpine/protéase à sérine	100
Figure 23 : Modélisation de la structure dimérique de l'antithrombine III.....	107
Figure 24 : Modèle d'un intermédiaire M* et d'un polymère de serpine	108
Figure 25 : Séquences nucléotidique et protéique déduite du gène <i>bovSERPINA3-3</i>	132
Figure 26 : Organisation structurale du gène <i>bovSERPINA3-3</i>	133
Figure 27 : Organisation des gènes du clade A présents au voisinage du ou des gène(s) <i>SERPINA3</i> chez le bovin, l'Homme, la souris et le porc	134
Figure 28 : Alignement des séquences protéiques des serpines bovines du clade A établies à partir des séquences exoniques.....	136
Figure 29 : Phylogénie des serpines du clade A chez le bovin.....	138
Figure 30 : Séquence de la protéine <i>bovSERPINA3-3</i> recombinante mature produite dans le système BL21 / pET19b.....	142
Figure 31 : Les différentes étapes de la purification de la protéine <i>bovSERPINA3-3</i> recombinante	144
Figure 32 : Structure tridimensionnelle d'un monomère de la protéine <i>bovSERPINA3-3</i> vu par transparence à travers la surface moléculaire	148
Figure 33 : Structure des N-glycosylations chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	184
Figure 34 : Mécanismes d'action de la N-Glycosidase F et de l'Endoglycosidase H.....	184
Figure 35 : Déglycosylation ménagée de la protéine <i>bovSERPINA3-3</i> produite chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	186
Figure 36 : Principe du test ELISA « en sandwich ».....	190
Figure 37 : Courbe de calibration de <i>bovSERPINA3-3</i> obtenue par ELISA	190

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	: Liste des indices estimés d'héritabilités obtenues par mesure de la force de cisaillement pour le caractère de tendreté	23
Tableau II	: Liste des indices estimés d'héritabilités obtenues par jury de dégustation pour le caractère de tendreté.....	27
Tableau III	: Liste des QTLs pour le caractère de tendreté disponibles dans les bases de données CattleQTLsdb et Bovine QTLs Viewer.....	31
Tableau IV	: Propriétés des différentes cathepsines des mammifères.	57
Tableau V	: Les calpaïnes identifiées chez les mammifères.....	66
Tableau VI	: Les clans, familles et résidus catalytiques des protéases à sérine	70
Tableau VII	: Les inhibiteurs de protéases à sérine.....	94
Tableau VIII	: Les clades des serpins.....	94
Tableau IX	: Exemples de protéases à cystéine inhibées par des serpins.....	102
Tableau X	: Taux de polymérisation, degrés de polymérisation et taux plasmatique des mutants de l' α 1-antitrypsine	105
Tableau XI	: Taux de polymérisation, nombre d'inclusions et gravité des signes cliniques de mutants de neuroserpine.....	106
Tableau XII	: Séquences promotrices et facteurs de transcription pouvant se lier dans la région 5'UTR du gène <i>bovSERPINA3-3</i>	138
Tableau XIII	: Constantes d'association (k_{ass}) des protéines <i>bovSERPINA3-3</i> musculaire, recombinante sauvage et mutantes	147
Tableau XIV	: Coefficient de variation de la répétabilité inter- et intra-essai du dosage ELISA.....	192
Tableau XV	: Test de récupération d'un extrait brut de collier (<i>Longus colli</i>) dilué au 3000ème avec l'anti-protéase <i>bovSERPINA3-3</i>	192
Tableau XVI	: Liste de protéines impliquées dans le métabolisme énergétique.....	196

AVANT-PROPOS

Les enzymes protéolytiques constituent des acteurs importants de la vie cellulaire. En effet, elles interviennent dans de nombreux mécanismes qui permettent de conserver l'homéostasie cellulaire, c'est-à-dire stabiliser les diverses constantes physiologiques afin de maintenir un état d'équilibre ou stationnaire. Ainsi, ces enzymes sont impliquées dans le métabolisme énergétique mais aussi dans de nombreux processus tels que la synthèse et la dégradation de protéines (*turn-over*), l'activation d'autres enzymes ou encore la différenciation cellulaire. En raison des multiples fonctions exercées par ces protéines, différentes régulations ont été mises en place afin de prévenir toute perturbation de l'homéostasie. Ces régulations ont lieu à différents niveaux ; de la synthèse même des enzymes, via la régulation de la transcription et/ou de la traduction, à la modulation de leur activité par des activateurs ou des inhibiteurs.

Après la mort de l'animal, certaines protéases demeurent actives et contribuent ainsi à une dégradation plus ou moins importante des constituants de la fibre musculaire notamment les myofibrilles. Cette protéolyse ménagée, selon son degré, conditionnera alors le niveau de tendreté de la viande. Cependant, dans le muscle *post-mortem*, le contrôle dynamique de ces enzymes peut être modulé par les changements de conditions physico-chimiques de la cellule et de son milieu, comme par exemple le pH. L'action de ces protéases sera également modulée par les inhibiteurs présents au sein de la cellule, tels que les inhibiteurs de protéases à sérine qui constituent, à ce jour, le meilleur marqueur biologique de la tendreté.

Mon travail de thèse s'est inscrit, pour partie, dans la continuité du travail de thèse réalisé par Carlos Herrera-Mendez (2006), consacré à la purification, la caractérisation et la quantification d'inhibiteurs de protéases à sérine dans le muscle squelettique bovin. Ses travaux avaient notamment abouti à l'identification et la caractérisation de deux inhibiteurs ayant pour cibles deux protéases à cystéine appartenant à la famille des caspases.

La partie bibliographique de mon manuscrit se décline en deux parties. La première rassemble des données génétiques liées à la tendreté des viandes bovines. La seconde est axée sur le processus de transformation du muscle en viande et se focalise sur les acteurs enzymatiques et leurs inhibiteurs. Une partie de mon travail concerne l'étude de la relation « structure-fonction » de l'anti-protéase bovSERPINA3-3. J'ai ainsi pu produire et purifier différentes protéines recombinantes sauvage et mutantes afin de déterminer certaines caractéristiques biochimiques et structurales. Enfin, dans un dernier volet de ma thèse, j'ai pu mettre au point un test ELISA nécessaire au dosage protéique des serpins A3 dans différents échantillons d'intérêt.

EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE

Selon l'Institut de l'Élevage, en France, le nombre de bovins a diminué, en quelques années, passant de plus de 21 millions de têtes en 1991 à un peu plus de 19 millions en 2007, dont environ 3,8 millions sont des vaches laitières et 4 millions sont des vaches allaitantes ou nourrices. Pour la production finie de gros bovins, les vaches constituent près de 45% de la production avec 1,77 millions d'animaux (soit 608 000 tonnes de poids vif). Les bœufs et les taureaux ne représentent que 8 et 35% de cette production, respectivement (soit 102 000 tonnes d'une part et 465 000 d'autre part). La consommation de viande bovine a régressé au cours de la même période, passant de 1,7 millions de tonnes en 1991 à 1,64 millions de tonnes en 2008 ; ce qui par habitant représente 26 kg de viande en 2008 (contre 36 kg en 1991). Près de 58% de la viande consommée est d'origine allaitante, le reste étant d'origine laitière (Productions bovines lait et viandes, Chiffres clés 2009, Institut de l'Élevage). Les raisons de cette diminution sont notamment de nouvelles attitudes de consommation, des considérations d'ordre diététique, et surtout le rapport qualité/prix qui est souvent jugé trop faible.

La qualité de la viande est définie par différents critères que sont l'hygiène, la valeur nutritionnelle ou encore la palatabilité. La palatabilité de la viande bovine, c'est-à-dire la caractéristique de sa texture, est une perception assez subjective. Elle est liée aux « ressentis » de chacun et dépend fortement des habitudes de consommation du pays ou de la région du globe dont la viande est originaire. Classiquement, la qualité de la viande est définie par différents critères que sont la couleur, la flaveur, la jutosité et la tendreté. Ainsi, la tendreté désigne la facilité avec laquelle une viande se laisse mastiquer. Cette dernière constitue d'ailleurs un motif récurrent d'insatisfaction de la part des consommateurs. En effet, une première étude menée par Means et King (1959, cité par Adams et Arthaud, 1970) a rapporté un coefficient de corrélation entre la tendreté et la satisfaction du consommateur de 0,90. Par la suite, différentes études de satisfaction menées auprès de consommateurs américains (« The Beef Customer Satisfaction Study ») ont montré que la tendreté représentait l'un, sinon LE facteur essentiel de la perception sensorielle de la viande et donc de sa qualité (Neely *et al.*, 1998, 1999 ; Lorenzen *et al.*, 1999 ; Savell *et al.*, 1999). Il ressort également de l'étude réalisée par Boleman *et al.* en 1997, que les consommateurs américains seraient prêts à payer un peu plus cher leur viande s'ils étaient sûrs que ses qualités organoleptiques, notamment la tendreté, étaient améliorées.

En Europe, la même conclusion a été apportée par l'étude d'Alfnes *et al.* (2005) qui indique que les consommateurs norvégiens seraient prêts à payer 50% plus cher si la viande achetée était jugée très tendre. Par ailleurs, de nouvelles demandes sociétales se font jour et les consommateurs semblent désormais attentifs au bien-être de l'animal (Schnettler *et al.*,

2006). Ces éléments indiquent qu'il faudrait pouvoir prendre en compte de tels aspects dans les méthodes d'élevage et introduire de nouveaux critères, comme la tendreté, dans les procédures de sélection des animaux destinés à la production de viande.

Les connaissances autour du bovin sont toujours en constante évolution. Le génome bovin est constitué de 2,87 milliards de paires de bases (Gpb) réparties sur 30 paires de chromosomes (29 chromosomes autosomaux et 1 paire de chromosomes sexuels). Le dernier assemblage réalisé en 2007 correspond à un recouvrement de 7,15 fois le génome complet (Btau_4.0). Quatre-vingt dix pourcents du génome sont validés pour les 29 autosomes et le chromosome X (Liu *et al.*, 2009). Le séquençage a débuté en octobre 2003, par les méthodes WGS (Whole Genome Shotgun) et le séquençage de BACs. Au final, le génome bovin contient 26835 gènes parmi lesquels 22000 codent des protéines (Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium *et al.*, 2009). Différents organismes ont participé au séquençage du génome bovin dont le Baylor College of Medicine Sequencing Centre de Houston, l'U.S. Meat Animal Research Center (MARC), l'USDA-Agricultural Research Service. Les différents instituts sont réunis au sein d'un consortium, le « Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium » auquel se sont associés un certain nombre de laboratoires dont les unités de Génétique Animale et Biologie Intégrative, Génétique et Génomique bovine et Génomique et Physiologie de la Lactation de l'INRA qui sont intervenus en tant que collaborateurs sur le projet.

Le nombre de SNPs (« Single Nucleotide Polymorphism », polymorphisme d'une base) répertoriés atteint aujourd'hui un peu plus de 2 200 000. Le séquençage a, au départ, été réalisé sur une vache de race Hereford. Les données de séquence du génome bovin sont disponibles sur différents sites tels que NCBI ou Ensembl (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ; <http://www.ensembl.org/index.html>). Plus récemment, le séquençage partiel d'animaux issus de différentes races bovines comme les races Limousine, Jersey, Holstein, Angus, Rouge de Norvège ou Brahman a permis d'enrichir les banques de données en enregistrant un très grand nombre de nouveaux SNPs, repérés notamment par comparaison avec la séquence Hereford de référence. Une carte comparative des génomes bovin et humain a par ailleurs été réalisée. Sur les 3484 marqueurs (de type microsatellites et ESTs) fixés du génome humain, 3204 marqueurs sont retrouvés sur le génome bovin (Everts-van der Wind, 2005).

Au cours de cet exposé bibliographique, je vais apporter des éléments destinés à comprendre pourquoi la tendreté de la viande est très variable, ce qui constitue un motif majeur d'insatisfaction de la part du consommateur. Après avoir précisé la notion de tendreté et

évoqué le processus de transformation du muscle en viande, je présenterai les diverses causes contribuant à la variabilité de la tendreté. Ensuite, je rapporterai les connaissances actuelles sur le déterminisme génétique de ce caractère et, enfin, je décrirai les aspects enzymatiques de la tendreté.

I. Qu'est-ce que la tendreté ?

I.1 Définition de la tendreté

La tendreté correspond à une somme de sensations perçues lors de la mastication de la viande et désigne la facilité avec laquelle celle-ci se laisse trancher ou mastiquer. A l'inverse, la dureté désigne la résistance que la viande présente au tranchage ou à la mastication.

La tendreté dépend de deux composantes protéiques structurales. La première correspond aux myofibrilles, plus particulièrement aux protéines constitutives des myofibrilles et aux différentes protéines qui leur sont associées et qui en assurent l'intégrité structurale. Les myofibrilles jouent un rôle important après l'abattage, au cours de la transformation du muscle en viande (phase de maturation de la viande) car c'est leur évolution qui est à l'origine de l'attendrissage de la viande. En effet, la protéolyse ménagée qui a lieu après la mort de l'animal, favorisera la fragilisation de la structure myofibrillaire sous l'action de différents systèmes protéolytiques (Koohmaraie *et al.*, 2002). La seconde composante musculaire correspond au tissu conjonctif et plus précisément au collagène. Le collagène est la protéine la plus abondante de la matrice extracellulaire (MEC). Elle représente, selon le muscle, jusqu'à 15% de la matière sèche (Purslow, 2005). Vingt-six variants génétiques ont été identifiés, regroupés en 21 types. Ils sont tous formés d'une triple hélice de pas droit constituée de chaînes α polypeptidiques donnant une superstructure dans la MEC (Lepetit, 2008). Cette triple hélice est constituée de 3 chaînes identiques (homotrimères) dans le cas des collagènes II, III, V, VI, IX et XI. Cette structure hélicoïdale confère une très grande résistance à cette protéine. Dans les muscles squelettiques bovins, 7 types différents de collagène ont été identifiés (Listrat *et al.*, 1999; Listrat *et al.*, 2000). Parmi eux, les collagènes de type I et III constituent les deux types majeurs du pérимysium et de l'épимysium (avec des proportions allant respectivement de 55 à 75%). Dans la couche réticulée de l'endomysium, les proportions sont de 25% pour le collagène de type I et de 45% pour le collagène de type III. Dans le pérимysium, des traces de collagènes de type V et VI ont également été observées. Dans l'endomysium, et plus précisément au niveau de la membrane basale qui est en contact avec le sarcolemme (la membrane plasmique des fibres musculaires), le collagène de type IV

est retrouvé en plus grande proportion (Light et Champion, 1984). Les proportions des différents types de collagène varient essentiellement en fonction de l'âge, du sexe, et du type de muscle de l'animal (Listrat *et al.*, 2000). Du fait de sa résistance importante, le collagène donne au muscle sa dureté de base. La viande sera donc d'autant plus dure que sa teneur en collagène sera élevée et que sa solubilité, qui reflète le degré des liaisons existantes entre les molécules, sera faible. Aussi, cette propriété détermine le mode de cuisson des viandes (viande à bouillir ou à griller). Ainsi, des viandes pauvres en collagène sont plutôt grillées, tandis que des muscles riches en collagène donnent des viandes dures, classées comme des viandes à bouillir et nécessitant un temps et une température de cuisson plus importants.

I.2 Mesure de la tendreté

La tendreté de la viande peut être déterminée par différents tests selon l'approche qui est choisie, soit en réalisant des mesures objectives que sont les mesures rhéologiques, soit en mettant en œuvre des méthodes plus subjectives reposant sur un test de dégustation. Parmi les différentes méthodes de mesures physiques existantes, les plus rencontrées dans la littérature sont celles qui permettent soit la mesure d'une force de cisaillement soit la mesure d'une force de compression.

L'estimation de la tendreté par la mesure des forces de cisaillement est l'approche la plus fréquemment utilisée (Boccard *et al.*, 1981). Il s'agit de mesurer la force nécessaire pour trancher un dé de viande (environ 10 mm de côté), cuit ou non, perpendiculairement aux fibres musculaires à l'aide d'une guillotine appelée cellule de Warner Bratzler. Pour un échantillon de viande, un nombre minimum de dés est analysé afin d'obtenir une estimation fiable de la mesure. La force et l'énergie maximale obtenues lors du tranchage du produit sont enregistrées.

La mesure de tendreté par force de compression se fait par un test dit de pénétrométrie. Un dé de viande de 10 mm de côté est comprimé progressivement. Les paramètres nécessaires pour atteindre un taux de compression de 20% puis de 80% de la hauteur de l'échantillon sont enregistrés. La compression s'effectue perpendiculairement au sens des fibres sur plusieurs prélèvements pour un même échantillon. La force et l'énergie maximale nécessaires sont enregistrées et permettent le calcul des mesures de cohésion (rapport entre le travail fourni lors des deux compressions) et d'élasticité (cohésion x force maximale obtenue lors de la première déformation).

La tendreté de la viande peut être également mesurée en faisant appel à un jury de dégustation, et deux types de jury existent : soit un jury d'experts (profil sensoriel), soit un

jury constitué de consommateurs « naïfs » (test hédonique). Ces tests restent cependant subjectifs, et la fidélité, la justesse, la sensibilité de l'analyse sensorielle sont dépendantes d'un nombre suffisant de membres et d'un échantillonnage représentatif de la population testée (Harris et Shorthose, 1988). Le recours à un jury composé de 10 à 12 experts constitue la méthodologie souvent considérée comme référente pour acquérir des données proches de la perception des consommateurs.

II. Transformation du muscle en viande

Il existe deux grandes phases lors de la transformation du muscle en viande, la phase d'installation de la rigidité cadavérique ou *rigor mortis* et la phase de maturation. Pendant la première phase, le muscle conserve encore une activité métabolique tandis que dans la seconde, le muscle connaît un certain nombre de modifications aboutissant à sa transformation en viande (figure 1).

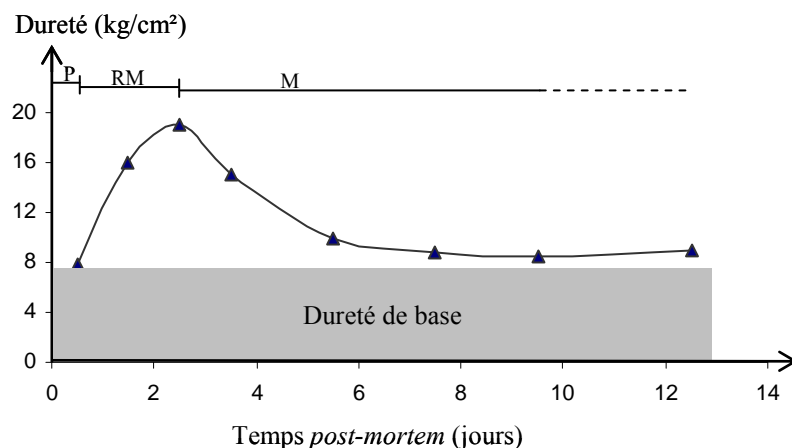


Figure 1 : Profil d'évolution de la dureté du muscle au cours de la conservation. P, état pantelang ; RM, rigor mortis ; M, maturation (adapté de Ouali, 1991).

II.1 La phase d'installation de la rigidité cadavérique

Malgré la mort de l'animal, l'homéostasie cellulaire permet de conserver son équilibre de fonctionnement pendant un temps variable. Ainsi, le glycogène musculaire va fournir de l'ATP par la phosphorylation de l'ADP. La phosphocréatine permet également la synthèse de l'ATP. Tant qu'elle est présente en quantité suffisante, le niveau d'ATP reste constant. Lorsque la phosphocréatine est épuisée, la glycolyse anaérobie prend le relais. Cette voie métabolique induit la production de lactate et son accumulation. Chaque molécule d'acide lactique produite est associée à la libération d'un proton. La diminution de pH alors

engendrée inactive les enzymes, conduisant alors à l'arrêt de la glycolyse et l'épuisement des réserves d'ATP du muscle. Cet épuisement définit l'étape de *rigor mortis*. Cependant, comme cet épuisement n'a pas lieu simultanément dans toutes les fibres, l'état de *rigor* ne s'installe pas partout au même moment provoquant ainsi des contractions au sein du muscle. La rigidité apparaît quant à elle progressivement (Jeacocke, 1984). Elle devient maximale lorsque le pH atteint une valeur voisine de 6,0.

Ouali (1990) a décomposé ce phénomène en différentes étapes. (i) La première, dite période de latence, ou état pantelant, est la période durant laquelle les muscles restent excitables pendant une courte durée correspondant au temps de survie du système nerveux périphérique (l'extension du muscle demeure constante comme au moment de l'abattage). Sa durée est variable en fonction des réserves énergétiques de l'animal. (ii) La deuxième est la période d'installation de la rigidité où une chute rapide des réserves énergétiques est observée. Elle s'accompagne de l'acidification et l'inextensibilité du muscle, la dureté est alors maximale. Sa durée est notamment dépendante du type musculaire. (iii) Enfin la dernière étape, dite *rigor* installée, est caractérisée par l'inextensibilité totale du muscle. Les deux dernières étapes constituent la phase de *rigor mortis*.

II.2 La phase de maturation

C'est durant la phase de transformation, ou maturation du muscle, que la viande commence à s'attendrir. Elle correspond à l'étape la plus importante car elle conduit à une augmentation de la tendreté de la viande. Ce processus de maturation est le résultat principalement de mécanismes enzymatiques qui conduisent à la dégradation partielle (protéolyse ménagée) des constituants myofibrillaires et donc à leur fragilisation structurale. Plusieurs systèmes enzymatiques semblent impliqués, au niveau du tissu musculaire, et agissent conjointement sur la maturation. Parmi les différents systèmes évoqués figurent les cathepsines lysosomales, le couple calpaïnes/calpastatine, système certainement le plus étudié, les protéases à sérine, les matrixines, le protéasome, et les caspases, dont l'implication dans le processus de maturation *post-mortem* du muscle en viande a été mise en évidence plus récemment. L'activité de ces systèmes enzymatiques dépend de la température, ainsi que de la vitesse et de l'amplitude de la chute du pH.

Dans la deuxième partie de cet exposé, je reviendrai plus en détail sur ces différents systèmes protéolytiques.

III. Les causes de variabilité de la tendreté

Comme évoqué précédemment, la tendreté de la viande est un caractère dont la variabilité demeure importante, ce qui engendre une insatisfaction de la part des consommateurs. Une meilleure maîtrise de la tendreté est donc recherchée par les acteurs de la filière et il existe plusieurs exemples de facteurs affectant la tendreté de la viande. Certains de ces facteurs sont maîtrisables par l'Homme, d'autres sont liés à l'animal ou encore relatifs aux caractéristiques physico-chimiques du muscle. La tendreté étant pour une part sous contrôle génétique, la partie suivante de cet exposé est un bilan des connaissances actuelles de son déterminisme génétique.

III.1 Facteurs maîtrisés par l'Homme

III.1.1 La température

La longueur du sarcomère influence la tendreté. Weaver *et al.* (2008) ont montré qu'une fibre ayant subi un raccourcissement présente une force de cisaillement supérieure à une fibre dont la longueur est augmentée. Ce raccourcissement est, en fait, influencé par la température à laquelle le muscle entre en *rigor*. L'étude menée par Locker et Hagyard (1963) a montré que le raccourcissement du muscle *sternomandibularis* est minimal lorsque le muscle est maintenu à une température voisine de 15°C (entre 14 et 19°C). Pour une température supérieure, la contraction musculaire a lieu au moment de la *rigor*. En dessous de 15°C, le raccourcissement survient avant la phase de *rigor*. La diminution de température provoque l'arrêt des pompes calciques ATP-dépendantes du réticulum sarcoplasmique et entraîne des fuites de calcium dans le sarcoplasme (Honikel et Hamm, 1978). Chez le bovin, la concentration calcique passe ainsi de 16 µM à 210 µM à 3 jours *post-mortem* (Ji et Takahashi, 2006). Cette augmentation de calcium intracellulaire stimule la liaison de l'actine et de la myosine et provoque la contraction musculaire. Cette phase est appelée contracture au froid ou « cold shortening ». Selon Bouton *et al.* (1974), le phénomène de « cold shortening » semble être lié à la structure des myofibrilles et conduit à une viande plus dure. En 1996, Willems et Purslow ont montré que des fibres musculaires sans tissu conjonctif provenant d'un muscle ayant subi le phénomène de « cold shortening » étaient plus dures que des fibres prises dans un muscle « au repos ».

A l'inverse, les muscles maintenus à une température trop élevée pendant de longues périodes *post-mortem* possèdent une plus grande activité glycolytique qui engendre une diminution très

rapide du pH. Cette chute brutale de pH ainsi que le maintien des muscles à une température plus élevée produit un raccourcissement qualifiant cet état de « rigor shortening » (retrouvé parfois sous le terme de « heat shortening »). Dans ce cas, la concentration en calcium cellulaire augmente également et stimule la contraction du muscle de la même manière que la contracture au froid. Cependant, comme il reste de l'ATP, les pompes calciques sont toujours activées et la libération de calcium dans la cellule est moindre. La contraction musculaire a donc lieu plus tard, durant la phase de *rigor* (Lee et Ashmore, 1985 ; Devine *et al.*, 1999).

III.1.2 La stimulation électrique

La stimulation électrique est une technique employée depuis la fin des années 70 sur des carcasses d'agneaux en Nouvelle-Zélande. Cette méthode permet d'induire des violentes contractions musculaires consommant toutes les réserves énergétiques et provoquent une chute très rapide du pH. Les stimulations se font à différentes fréquences accompagnées ou non de contractions concentriques. Elles permettent de diminuer la force de cisaillement mais il semble qu'une stimulation de 150 Hz n'apporte pas d'amélioration par rapport à une carcasse stimulée à 5 Hz (Simmons *et al.*, 2008). Ainsi, après le stockage à 0 °C et maturation pendant 2 semaines, des muscles bovins *longissimus* ayant subi une stimulation électrique présentent une force de cisaillement plus faible ainsi qu'une diminution du pH (40 à 70 N et 5,5 à 6,2, respectivement) par rapport à des muscles non-stimulés. La stimulation semble également empêcher le durcissement de la viande enveloppée ou non dans un film de polyéthylène et ce, à la fois à des températures optimales ou même plus élevées au stade *pre rigor* (Rosenvold *et al.*, 2008).

III.1.3 L'accrochage des carcasses

Après l'abattage des animaux, les carcasses sont stockées dans des chambres froides afin de permettre le phénomène de maturation *post-mortem* du muscle en viande. Le stockage se fait par accrochage des carcasses soit par suspension par les tendons d'Achille soit par suspension pelvienne.

La suspension par les tendons d'Achille : Il s'agit de la pratique d'accrochage la plus couramment usitée dans les abattoirs pour stocker les carcasses. Quand une carcasse est suspendue, son poids permet de générer des tensions qui favorisent l'étirement de différents muscles (comme le *longissimus*) avant le début de la phase de *rigor* et permettent de prévenir le phénomène de « cold shortening ».

La suspension pelvienne : Cette méthode permet l'accrochage des carcasses par le bassin. Elle permet de prévenir le phénomène de raccourcissement par le froid en étirant les muscles. Cette technique s'oppose cependant à celle « classique » de suspension par les tendons d'Achille. En effet, les membres de la partie arrière de l'animal se retrouvent perpendiculaires aux vertèbres alors que dans le cas de la suspension par les tendons d'Achille, la carcasse est toujours en position verticale. Suivant le muscle considéré et sa position, l'effet de la suspension pelvienne ne permet pas toujours d'augmenter la tendreté. Si le muscle est étiré, une amélioration est notée. S'il est comprimé c'est le contraire. Enfin, si le muscle conserve sa position, la tendreté dépendra des muscles environnants (Tribot Laspiere, 2001). D'après Holstetler *et al.* (1970), la suspension par le trou ischio-pubien (ou foramen obstrué) de la carcasse permettait d'obtenir une meilleure tendreté des muscles *longissimus dorsi* et *semimembranosus* mais n'aurait que peu d'influence sur celle du muscle *semitendinosus*. Plus tard, Joseph et Connolly (1977) ont testé l'effet de la suspension pelvienne. Ils ont pu confirmer que la tendreté était améliorée pour les muscles *longissimus*, *semimembranosus*, *gluteus medius* mais pas *semitendinosus* (sûrement à cause du tissu conjonctif et du tendon qui le relie).

III.1.4 La cuisson

La cuisson est également un élément à prendre en compte pour la tendreté. En effet, une cuisson lente améliore la tendreté. La diffusion de la chaleur qui se fait de façon lente et de manière homogène, augmente ainsi la solubilisation du collagène et rend la viande plus facile à trancher (Penfield et Meyer, 1975). Cependant, ce n'est pas le cas pour tous les muscles. Pour le muscle *longissimus*, par exemple, la tendreté varie peu quelque soit le mode de cuisson (Lawrence *et al.*, 2001 ; King *et al.*, 2003).

III.1.5 Le régime alimentaire

L'alimentation des animaux est un facteur non négligeable de variabilité de la tendreté. Selon le type d'alimentation fourni, le développement et la croissance des animaux mais aussi les caractéristiques musculaires seront modifiées. En cas de restriction alimentaire, chez les bovidés, une diminution du nombre de fibres glycolytiques est observée (Picard *et al.*, 1995). Par ailleurs, une réduction du « turn-over » (synthèse et dégradation) des protéines myofibrillaires, une augmentation du taux de collagène ainsi qu'une baisse de sa solubilité ont été constatés, ce qui constitue des éléments défavorables pour la tendreté (Jones *et al.*, 1990 ;

Miller *et al.*, 1987). En cas de réalimentation des bovins (surtout au printemps après les limitations des rations hivernales), un phénomène de croissance compensatrice est observé. Selon les études, les résultats de cette croissance sur la tendreté sont variables. Ainsi, dans l'étude de Allingham *et al.* (1998), une amélioration de la tendreté du muscle *semitendinosus* est observée, potentiellement due à la synthèse de collagène soluble. Dans l'étude de Cassar-Malek *et al.* (2004), la compensation semble avoir un faible impact sur les caractéristiques du muscle *triceps brachii*. Il est à noter cependant une légère amélioration de la tendreté due à une meilleure solubilité du collagène. Par contre, aucun changement de tendreté n'a été constaté par Sinclair *et al.* (2001) et Dufey (2006). Enfin une alimentation à base d'herbe de pâturages avec de faibles apports en concentrés montre un effet bénéfique sur la tendreté après 2 jours de maturation (French *et al.*, 2000).

De nombreuses substances ont également été développées afin de permettre l'amélioration du rendement des carcasses ainsi que leur composition. Ces substances agissent en modifiant le métabolisme, mais peu ont été utilisées afin d'augmenter les qualités organoleptiques de la viande. En effet, dans la plupart des cas, elles n'améliorent pas les qualités de la viande et lui confèrent une couleur noire. Ainsi, l'étude de Dikeman (2007) a montré que des implants de stéroïdes anabolisants diminuent le persillé ainsi que la tendreté de la viande. L'auteur a également souligné que les implants n'apportent rien aux qualités de la viande comme l'avaient constaté Morgan (1997) et plus récemment Smith *et al.* (2007). Barham *et al.* (2003) ont noté que chez des animaux croisés dans lesquels des implants de progestérone et d'oestradiol avaient été posés, la viande produite présente, après 14 jours de maturation, une valeur de force de cisaillement supérieure à celle provenant d'animaux n'ayant pas eu d'implants. L'agoniste β , le zilpaterol hydrochloride (commercialisé sous le nom Zilmax[®]), stimule la performance de croissance et la musculature des animaux. Strydom et Nel (1999) ont montré un impact négatif sur la force de cisaillement du muscle *longissimus* pour des animaux ayant reçu une alimentation supplémentée en zilpaterol à 45 jours. De même, Leheska *et al.* (2009) ont confirmé que cet agoniste affecte de manière négative la tendreté mais aussi la flaveur et la jutosité. Des vitamines ont également été testées. Seule la vitamine D₃ semble avoir un rôle dans la tendreté de la viande. Elle augmente la quantité de sang et le taux de calcium et semble améliorer la tendreté de la viande à 24 heures *post-mortem* (Swanek *et al.*, 1999). En revanche, les animaux sont moins performants et mangent moins. Des études ont été menées sur les vitamines E et A. Bien qu'un apport de ces substances ait un impact sur la viande, elles ne semblent pas agir sur la tendreté. La vitamine E améliore la

couleur de la viande et la vitamine A diminue le taux de gras intra-musculaire (persillé) (Faustman *et al.*, 1989 ; Gorocica-Buenfil et Loerch, 2005 ; Kruk *et al.*, 2008).

En résumé, les facteurs technologiques influencent de façon certaine l'attendrissage de la viande et le niveau final de tendreté. Ainsi, la préparation et la conservation de la carcasse sont des éléments qui conditionneront le bon déroulement du phénomène de maturation *post-mortem* du muscle en viande. De même, la tendreté sera dépendante de la méthode de cuisson de la viande. Celle-ci varie d'ailleurs selon les études et les pays en fonction des habitudes de consommation. Ainsi, une cuisson inappropriée détériorera dramatiquement les qualités gustatives de la viande. Le régime alimentaire fourni aux animaux semble aussi avoir un impact sur leur développement ce qui influera, là aussi, sur la maturation *post-mortem* des muscles. Par contre, bien qu'améliorant les rendements et compositions des carcasses, l'emploi de compléments alimentaires, à l'exception de la vitamine D₃, n'apporte rien à la tendreté de la viande.

III.2 Facteurs liés à l'animal

III.2.1 Le comportement des animaux

Le tempérament des animaux constitue un facteur à prendre en compte dans le déterminisme de la tendreté. Il a été montré que les animaux ayant un comportement « excité » présentent une viande plus dure que des animaux présentant un comportement calme (Voisinet *et al.*, 1997 ; King *et al.*, 2006 ; Behrends *et al.*, 2009).

III.2.2 Le sexe des animaux

Le sexe de l'animal influe non seulement sur la tendreté mais également sur la couleur de la viande. Ainsi, à un âge équivalent, les génisses, contrairement aux taurillons, présentent des viandes plus rouges résultant de l'augmentation plus rapide de la teneur en myoglobine au cours de la croissance (Monin, 1991). En ce qui concerne la tendreté, des résultats contradictoires ont été obtenus. Chez les taurillons, le taux de collagène, son insolubilité ainsi que la taille des fibres sont plus importants que chez les femelles, ce qui conduit à une viande plus dure. Soo Kim *et al.* (2007) et Jeleníková *et al.* (2008) ont observé une plus grande tendreté de la viande des vaches et des génisses par rapport aux bœufs et aux taureaux. Par contre, d'autres études ont montré une plus grande dureté de viande chez les génisses que chez les bœufs (Choat *et al.*, 2006). De plus, aucune différence de tendreté n'a pu être mesurée entre des animaux castrés et non castrés (bien qu'une plus forte variabilité ait été observée chez ces derniers) et ce à n'importe quel âge (Gerrard *et al.*, 1987).

III.2.3 Variation inter- et intra-races et inter-espèces

Une variabilité individuelle importante existe au sein de chaque race, comme l'attestent les travaux de Dransfield *et al.* (2003). Une différence entre les caractéristiques bouchères des viandes provenant d'animaux *Bos taurus* ou *Bos indicus* a été mise en évidence. Plus un animal possède une part génétique de races Brahman ou Sahiwal (*Bos indicus*) élevée, plus la viande est dure avec une augmentation des valeurs de force de cisaillement et une plus faible appréciation gustative (Crouse *et al.*, 1989 ; Sherbeck *et al.*, 1996). La viande de buffle d'eau et celle de la race Brahman présentent une différence de tendreté (Neath *et al.*, 2007). Cette différence s'explique par le pH et son effet sur les protéases musculaires. En effet, le pH chute moins rapidement chez le buffle d'eau que chez un animal croisé *Bos indicus*. Ceci permet de prolonger l'activité des différentes protéases. Ainsi une diminution plus importante de la valeur de la force de cisaillement est observée pour le muscle *semimembranosus* du buffle d'eau, par rapport à l'autre espèce. Cette diminution est également observée dans l'étude d'Irurueta *et al.* (2008) sur le muscle *longissimus dorsi* du buffle d'eau élevé dans le Delta del Paraná en Argentine. Aucune différence significative dans les qualités sensorielles de la viande entre les races Aubrac et Salers (races rustiques) d'une part, et les races Charolaise et Limousine (races à viande), d'autre part, n'a pu être révélée, avec, tout de même, des qualités légèrement supérieures pour les races Limousine et Aubrac. Sinclair *et al.* (2001) ont montré que, bien que les notes de tendreté du muscle *longissimus lumborum* pour la race Holstein soient plus faibles que pour les deux autres races Aberdeen Angus et Charolais testées, cela ne reflétait aucune relation entre la vitesse de croissance et la tendreté. Bruce *et al.* (1991) ont fait le même constat pour des animaux ayant au final les mêmes gains de poids. Jurie *et al.* (2007) ont comparé les caractéristiques musculaires et les aptitudes bouchères sur quatre muscles, *longissimus thoracis* (LT), *semimembranosus* (SM), *semitendinosus* (ST) and *triceps brachii* (TB) provenant d'animaux de race laitière (Holstein) et de race à viande (Salers) abattus à âge équivalent et ayant la même note de gras. Il ressort qu'il n'y a pas de différence importante de tendreté entre les deux races. Cependant, le muscle ST présentait l'activité glycolytique la plus importante et le muscle TB avait le potentiel le plus oxydatif. En ce qui concerne la tendreté, le muscle ST a obtenu les meilleurs résultats. Les auteurs ont également constaté que plus le muscle possède un fort potentiel oxydatif et une teneur faible en collagène soluble et insoluble, plus la viande obtenue est tendre. Ils en conclurent que le type musculaire et non la race explique la variabilité de la qualité de la viande observée. Zamora *et al.* (1996) ont

montré qu'entre les muscles *longissimus lumborum* et *longissimus thoracis* provenant d'animaux de même race, la dureté de la viande pouvait varier d'un facteur 3 et la vitesse de maturation d'un facteur 20 entre les animaux.

Dans une autre étude, Monsón et Sierra (2004) ont cherché à évaluer l'influence de la race sur les caractéristiques sensorielles de la viande en fonction du temps de maturation de la viande. Une influence sur la tendreté a bien été constatée entre les quatre races testées (Blonde d'Aquitaine, Limousine, Holstein et Brown Swiss). De plus, concernant la tendreté, une très forte influence a aussi été constatée entre la race et la période de maturation. Au-delà de 7 jours de maturation, les caractéristiques musculaires entre les races tendent à s'estomper. Dans l'étude de Vieira *et al.* (2007), aucune différence de tendreté du muscle *longissimus thoracis* n'a été constatée entre les races Limousine, Brown Swiss et Asturiana de los Valles ; une diminution de la force de cisaillement a tout de même été notée entre 14 et 28 jours de maturation (le jury de dégustation n'ayant, pour sa part, relevé aucune différence).

Le comportement et le sexe des animaux se révèlent être des critères importants pour la tendreté de la viande. Le niveau de stress subi par l'animal, notamment lors de son transport, entraîne des modifications du métabolisme musculaire avant et après la mort de l'animal sur les qualités des viandes. Comme le laissent supposer plusieurs études, la variation inter-espèces est également très importante. Des animaux *Bos taurus* présentent une viande plus tendre que des animaux *Bos indicus*. De plus, des animaux issus de races à viande sont aptes à mûrir plus rapidement que ceux issus de races laitières.

III.3 Facteurs physico-chimiques et biologiques

III.3.1 Le pH

La phase d'installation de la rigidité cadavérique, qui suit l'abattage de l'animal, entraîne une chute de pH et à 24 heures *post-mortem*, le pH atteint son pH ultime (pHu) qui se situe entre 5,4 et 5,7 (Marsh, 1993). Une viande avec un pHu élevé (> 6,5) se présente comme une pièce noire, ferme et sèche. Le pHu élevé est dû à un taux de glycogène musculaire plus faible que dans un muscle normal au moment de l'abattage. Ce faible taux conduit donc à une faible production de lactate. La tendreté qui en résulte est sujette à controverse. Certains auteurs supposent que la viande est plus tendre car la diminution de substrat utilisée dans la glycolyse provoque un épuisement plus rapide d'ATP et un état de *rigor* plus précoce (réduisant la susceptibilité au « cold shortening »), ce qui permet de prolonger l'activité des

protéases (Watanabe *et al.*, 1996). Pour d'autres, cette viande présentait des forces de cisaillement plus élevées (+ 46%) et une plus faible palatabilité que la viande normale (Wulf *et al.*, 2002).

Inversement, une viande avec un faible pH a des qualités gustatives médiocres ; les enzymes sont inhibées par l'acidification qui s'accompagne d'une augmentation de la perte en eau. L'augmentation de l'acidité dans le muscle (donc un faible pH) provoque l'inhibition des enzymes protéolytiques et empêche ainsi toute dégradation. De plus, le gonflement du collagène provoqué par son hydratation va provoquer une diminution de la température de « transition thermique » du collagène. Le collagène va alors pouvoir se transformer plus facilement en gélatine. La viande perd ses qualités organoleptiques et devient alors inacceptable pour le consommateur (Berge *et al.*, 2001 ; Miles *et al.*, 2005).

III.3.2 Le pouvoir tampon

Une source de variation de la tendreté de la viande est liée au pouvoir tampon de différents types de fibres. Les tampons sont majoritairement constitués de phosphates, des composés dérivés d'histidine tels que la carnosine et l'ansérine, qui sont en quantités plus importantes dans les muscles à fibres rapides que dans les muscles à fibres lentes (Abe, 2000). Cependant, aucune relation n'a pu être établie entre la tendreté et les concentrations en carnosine et ansérine (Boldyrev et Severin, 1990).

III.3.3 Le tissu conjonctif

Le tissu conjonctif est un facteur potentiellement important de la tendreté de la viande bovine. Il expliquerait jusqu'à 12,4% des variations constatées (Cross *et al.*, 1973). Un des mécanismes pouvant survenir dans le phénomène, et lié au tissu conjonctif, est la rupture des liaisons covalentes qui se forment dans le collagène. Ainsi, la force du tissu conjonctif devient plus faible lorsque le pH diminue (Lewis et Purslow, 1991). Ainsi, à faible pH, une fragilisation du tissu conjonctif par rupture des liaisons covalentes surviendrait. Il faut également souligner qu'il existe une variation intramusculaire dans la teneur en collagène totale entre les muscles *semimembranosus* et le *longissimus* (7,68 et 4,52 mg/g de muscle respectivement ; Rhee *et al.*, 2004) Cette quantité totale n'explique pas les différences de tendreté retrouvées entre les races (Norman, 1982).

L'âge de l'animal doit également être pris en compte. Ainsi, Reagan *et al.* (1976) ont mis en évidence que la variation de force de cisaillement, observée dans le muscle *longissimus* de génisses âgées de 10 mois à 27 ans, était due à la quantité totale de collagène. Cette étude a

aussi montré des différences en collagène soluble entre races. Nous pouvons également noter que la quantité de collagène intramusculaire est supérieure chez les taureaux par rapport aux bœufs (Gerrard *et al.*, 1987). Les travaux réalisés par Kopp et Bonnet (1982) et Dransfield *et al.* (2003) ont mis en évidence une très forte corrélation entre la force de cisaillement de la viande crue et la teneur en collagène (avec des coefficients de détermination de 0,81 dans la première étude et 0,95 dans la seconde). Il existe également une corrélation positive entre la quantité totale de collagène musculaire et la force de cisaillement de la viande cuite (Riley *et al.*, 2005). Par contre, dans l'étude de Li *et al.* (2007a), une corrélation faible et négative entre la teneur totale en collagène et la dureté de la viande a été relevée, aussi bien pour une viande cuite que crue.

L'étude de Jeremiah *et al.* (2003) a révélé que la quantité de collagène insoluble est un facteur (négatif) influençant fortement la tendreté de la viande et que sa variation expliquerait jusqu'à 26% des variations observées. Plus récemment, Li *et al.* (2007a) ont aussi retrouvé une corrélation négative mais avec des valeurs plus faibles aussi bien dans la viande cuite que crue. Riley *et al.* (2005) ont eux aussi souligné l'importance du collagène insoluble sur la force de cisaillement chez des animaux de race Brahman, mais, cette fois-ci avec des coefficients de corrélation positifs, tout comme Torrescano *et al.* (2003) qui ont déterminé un fort coefficient de corrélation entre la force de cisaillement et le collagène insoluble dans 14 muscles bovins crus de race Brown Swiss ($r = 0,661$, $P < 0,01$), ou encore Failla *et al.* (2008) qui ont obtenu des corrélations plus importantes dans le cas de la viande crue que cuite (0,72 vs 0,50 respectivement). En ce qui concerne le collagène soluble, une faible corrélation avec la mesure de la force de cisaillement est retrouvée ($r = -0,10$).

En ce qui concerne l'élastine, les variations trouvées ne sont pas forcément associées avec la tendreté de la viande (Cross *et al.*, 1973). Une étude a montré une relation positive entre la dureté de la viande et la quantité d'élastine musculaire (Mason et Moreau, 1975, cité par Lepetit, 2008).

Au-delà de la teneur en collagène ou en élastine, c'est la matrice extracellulaire, dont les protéoglycanes font partie, qui joue un rôle important. Sandrin *et al.* (2004 et cité par Lepetit, 2008) ont établi qu'une diminution de la capacité élastique du perimysium était due à une diminution de près de 20% de la matrice du protéoglycane. Lewis *et al.* (1991) ont découvert qu'il y avait une diminution de la résistance à la traction du perimysium du muscle *semitendinosus* entre une viande crue et une viande cuisinée à 50°C.

III.3.4 Variation intra- et inter-musculaires

Reuter *et al.* (2002) ont mené une étude afin de définir les variations de tendreté intramusculaire au sein de quatre muscles ronds bovins (*biceps femoris*, *semitendinosus*, *semimembranosus* et adducteur) et cela sur des bœufs Angus et Limousin-Angus (10 animaux en tout). Selon ces auteurs, il existe une plus grande variabilité de tendreté de la viande au sein de ces quatre muscles qu'entre animaux. De plus, à l'intérieur même des muscles *semitendinosus* et *biceps femoris*, une plus grande variabilité a aussi été trouvée par Shackelford *et al.* (1997). Ainsi, selon cette étude, le muscle *semitendinosus* serait, dans sa moitié antérieure, destiné à une consommation sous forme grillée, alors que la moitié postérieure devrait être consommée sous forme rôtie. Ces différences seraient dues à la quantité, au type et à la solubilité du collagène ainsi qu'à la chute de température *post-mortem*. Par contre, l'épaisseur du perimysium n'affecte pas la tendreté de la viande, qu'elle soit soumise à stimulation électrique ou non (Brooks et Savell, 2004). L'étude de Denoyelle et Lebihan (2003) a confirmé qu'il existait bien une différence intramusculaire du niveau de tendreté dans le *semitendinosus*. Cette variation intramusculaire a également été retrouvée dans deux autres muscles (*triceps brachii* et *rectus femoris*) provenant de 48 carcasses de deux races allaitantes (Maine Anjou et Charolais) et pour lesquels les mesures de force de compression ont été réalisées sur des morceaux crus.

III.3.5 Le type de fibres

Les résultats obtenus concernant l'effet du type de fibres sur la tendreté de la viande sont contradictoires. Bouley *et al.* (2004) ont montré, par une étude protéomique, que les muscles *semitendinosus* de taurillons Charolais, Limousins et Salers orientés dans un métabolisme de type oxydatif et classés selon leur tendreté sensorielle, donnent des viandes tendres. Ces résultats sont en accord avec les données obtenus par Bernard *et al.* (2007) sur des muscles *longissimus thoracis* d'animaux de race Charolaise. En revanche, il a également été observé que l'orientation vers le type rapide et glycolytique de muscles *longissimus thoracis* et *lumborum* de races Blonde d'Aquitaine et Charolaise améliore la maturation de la viande et donc sa tendreté finale notamment pour des viandes (crues ou cuites) ayant subi une maturation de moins d'une semaine (Monsón et Sierra, 2004). Il semblerait, en fait, que le pourcentage de fibres rapides oxydoglycolytiques (type IIA) soit un facteur défavorable à la tendreté de la viande, et non pas les proportions de fibres lentes oxydatives (type I) ou rapides glycolytiques (type IIB ; Dransfield *et al.*, 2003). La dureté de la viande Charolaise a été positivement corrélée avec la capacité oxydative (par la mesure de l'activité de la citrate

synthase) de la fibre ou avec des fibres ayant des activités plus oxydatives que glycolytiques (Zamora *et al.*, 1996 ; Ozawa *et al.*, 2000). Strydom *et al.* (2000) ont, quant à eux, montré que les muscles ayant une forte proportion de fibres oxydatives à contraction lente ou ayant une faible proportion de fibres glycolytiques à contraction rapide présentent une viande plus tendre. Ceci est, en revanche, en contradiction avec les résultats de Vestergaard *et al.* (2000) qui n'ont trouvé aucune relation entre le type de fibres des muscles *semitendinosus*, *longissimus dorsi* ou *supraspinatus* et la qualité de la viande.

Les caractéristiques physiologiques propres à chacun des muscles vont leur conférer des propriétés physico-chimiques qui conditionneront leur maturation *post-mortem*. Le tissu conjonctif est aussi une caractéristique qui apportera une dureté basale à la viande, établissant alors sa classification en temps que viande à cuire ou à bouillir.

IV. Déterminisme génétique de la tendreté

Depuis des siècles, les éleveurs ont sélectionné les meilleurs animaux dans différentes races bovines afin d'en améliorer les caractéristiques, soit pour la production de lait, soit pour la production de viande. Les caractères concernés sont par exemple la quantité de lait et les taux protéiques ou butyreux dans le premier cas, et les paramètres de croissance ou de conformation dans le second cas. Le principe des méthodes de sélection utilisées jusqu'à présent repose sur le recueil de performances en ferme et l'évaluation génétique des taureaux en fonction des performances de leurs descendants. Globalement, les caractères pris en compte ont été ceux pour lesquels la mesure des performances peut être réalisée assez aisément sur un très grand nombre d'animaux et qui possèdent une bonne héritabilité. Cependant, cette méthodologie n'a pas permis de considérer des caractères faiblement héritables ou difficiles à mesurer (mesures trop coûteuses ou nécessitant l'abattage systématique des animaux) et possède donc des limites. Les producteurs de bovins allaitants ont donc fait appel aux chercheurs pour les aider à améliorer les qualités des viandes qui représentent aujourd'hui l'exemple même de caractères non soumis à sélection. Comme nous l'avons évoqué rapidement, les connaissances sur le génome bovin se sont beaucoup enrichies ces dernières années, et, nous disposons maintenant de nombreux outils moléculaires (marqueurs microsatellites et SNPs) et de technologies d'investigation performantes (analyses transcriptomiques et protéomiques notamment). L'objectif est donc d'élaborer des procédures de sélection se basant sur la connaissance du génotype des animaux soit pour certains marqueurs, soit plus exactement pour certains gènes dont il aurait été établi que les polymorphismes sont en relation (en association) avec la variabilité des caractères d'intérêt.

Comme nous l'avons vu précédemment, de nombreux facteurs de variation de la tendreté ont été mis en évidence. Très tôt, les scientifiques se sont intéressés à savoir s'il existait un déterminisme génétique de la tendreté. Cette donnée est essentielle pour envisager de mieux la maîtriser en influant sur la part génétique de la variabilité qui pourrait exister. Yao et Hinner (1953) ont ainsi été les premiers à chercher si la tendreté était un caractère déterminé génétiquement via la mesure de l'héritabilité. L'héritabilité est une statistique estimant le degré d'influence probable des facteurs génétiques pour un phénotype donné dans une population donnée. Elle permet donc de quantifier la part des facteurs environnementaux (acquis) et des facteurs génétiques (inné) dans la constitution du phénotype d'une population. Dans les tableaux I et II est répertorié un certain nombre de mesures d'héritabilité publiées pour le caractère de tendreté estimée soit par mesure de la force de

Tableau I : Liste des indices estimés d'héritabilités obtenues par mesure de la force de cisaillement pour le caractère de tendreté (adapté et actualisé de Burrow *et al.*, 2001)

Héritabilité	Méthode	Race	Nombre d'animaux	Sexe	Muscle	Référence
0,77	PHSC	Shorthorn	N.D.	B	N.D.	Yao et Hiner (1953)
0,86-1,02†	PHSC	F1 Brahman x Hereford et Hereford	38	B	LD et ST	Cover <i>et al.</i> (1957)
0,92	PHSC	Angus	60	B et G	N.D.	Kieffer <i>et al.</i> (1958)
0,62-0,69	PHSC	Angus	176	B et G	LD	Christians <i>et al.</i> (1961)
0,39 ± 0,26	PHSC	Croisés <i>Bos indicus</i> x <i>Bos taurus</i>	241	N.D.	N.D.	DuBose et Cartwright (1967)
0,51	PHSC	Hereford	217	B	LM	Adams et Arthaud (1970)
0,00	PHSC	Hereford	679	B	LD	Dinkel et Busch (1973)
0,17 ± 0,10	PHSC	Hereford x (Angus x Friesian)	646	B et G	LD	Wilson <i>et al.</i> (1976)
0,31 ± 0,08	PHSC	Clay Centre GPE groups	2453	B	LD	Koch <i>et al.</i> (1982)
0,30 ± 0,07	HM3	Charolais, Blonde d'Aquitaine, Limousine, INRA 95 et Coopelso	1828	T	LD	Renand (1985)
0,00	PHSC	Friesian	218	B	LD	More O'Ferrall <i>et al.</i> (1989)
0,09 ± 0,13	REML	Groupes du programme GPE (Clay Centre)	682	B	LD	Van Vleck <i>et al.</i> (1992)
0,12 ± 0,08	REML	3 races <i>Bos taurus</i> composites	1599	B	LD	Gregory <i>et al.</i> (1994)
0,65 ± 0,19	REML	Groupes du programme GPE (Clay Centre)	555	B	LD	Shackelford <i>et al.</i> (1994)

Tableau I (suite)

0,05 ± 0,09		Groupes de races pures du programme GPE (Clay Centre)	1153			
0,31 ± 0,17	PHSC	Groupes de <i>Bos taurus</i> composite du programme GPE (Clay Centre)	441	B	LD	Gregory <i>et al.</i> (1995)
0,12 ± 0,08		Groupes du programme GPE (Clay Centre, toutes races confondues)	1594			
0,12 ± 0,10 ^a						
0,28 ± 0,15 ^b						
0,12 ± 0,10 ^c						
0,29 ± 0,15 ^d	HM3	Croisés <i>Bos Taurus</i> (mesure à 1 jour (a), 4 jours (b), 7 jours (c), 14 jours (d), 21 jours (e), 35 jours (f) <i>post-mortem</i> et mesure totale (g))	392	B et G	LD	Wulf <i>et al.</i> (1996)
0,36 ± 0,18 ^e						
0,14 ± 0,11 ^f						
0,31 ± 0,16 ^g						
0,02 ± 0,06		Groupes du programme GPE (données du Groupe I)	1431	B et G		
0,27 ± 0,29	REML	Groupes du programme GPE (données du Groupe II)	237	B et T	LD	Barkhouse <i>et al.</i> (1996)
0,31 ± 0,29		Groupes du programme GPE (données combinées des groupes)	1668	B, T et G		
0,37 ± 0,12	PHSC	Groupes du programme GPE (Clay Centre)	888	B	LD	Wheeler <i>et al.</i> (1996)
0,20 ± 0,16 ^h						
0,17 ± 0,15 ⁱ						
0,47 ± 0,20 ^j	REML	Races <i>Bos taurus</i> et <i>Bos indicus</i> et croisements (mesure à 1 jour (h), 4 jours (i), 7 jours (j), 14 jours (k), 21 jours (l), 35 jours (m) <i>post-mortem</i>)	575	B et G	LD	O'Connor <i>et al.</i> (1997)
0,27 ± 0,17 ^k						
0,36 ± 0,18 ^l						
0,19 ± 0,10 ^m						

Tableau I (suite)

0,02 ⁿ						
0,24 ^o	REML	Races <i>Bos taurus</i> , <i>Bos indicus</i> et croisements (part génétique de Brahman : n, faible; o, modéré ; p, fort)	1530	B	LD	Crews et Franke (1998)
0,36 ^p						
0,58 ^q						
0,17 ^r						
0,25 ^s	REML	Races <i>Bos taurus</i> Angus (A), <i>Bos indicus</i> Brahman (B) et croisements (q, A x A ; r, B x B ; s, A x B ; t, ½A ½B x A ; u, ½A ½B x ¼A ¼B)	486	B	LD	Elzo <i>et al.</i> (1998)
0,43 ^t						
0,42 ^u						
0,26 ± 0,06	REML	Groupes du programme GPE (Clay Centre)	3704	B	LD	Splan <i>et al.</i> (1998)
0,24 ± 0,12						
0,29 ± 0,12	PHSC	Groupes du programme GPE (Clay Centre)	854	B	LT	Wheeler <i>et al.</i> (2001)
0,11		Angus, Hereford, Shorthorn et Murray Green	3357		ST	
0,09	REML	Brahman, Belmont Rouge et Santa Gertrudis	3322	T	LD+LT	Johnston <i>et al.</i> (2003)
0,42		Angus, Hereford, Shorthorn et Murray Green	3587		ST	
0,30		Brahman, Belmont Rouge et Santa Gertrudis	3506		LD+LT	
0,14 ^v						
0,14 ^w	REML	Brahman (mesure à 7 jours (v), 14 jours (w), 21 jours (x) <i>post-mortem</i>)	504	B et G	LD	Riley <i>et al.</i> (2003)
0,06 ^x						

Tableau I (suite)

0,29 ± 0,06	REML	Groupes du programme GPE (Clay Centre)	3652	B	LD	Nephawe <i>et al.</i> (2004)
0,16 ± 0,15	PHSC	Groupes du programme GPE (Clay Centre)	568	B	LT	Wheeler <i>et al.</i> (2004)
0,40	REML	Groupes du Carcass Merit Traits	7179	B et G	LD	Dikeman <i>et al.</i> (2005)
0,24 ± 0,05		Charolais	401			
0,22 ± 0,05	REML	Limousin	446	B	LT	Renand (2006)
0,23 ± 0,05		Blonde d'Aquitaine	367			
0,29 ± 0,14 ^y	REML	Brahman (mesure à 7 jours (y) et 14 jours (z) <i>post-mortem</i>)	2155	B	LM	Smith <i>et al.</i> (2007)
0,20 ± 0,11 ^z						

REML (Restricted Estimated Maximum Likelihood) : maximum de vraisemblance résiduelle

HM3 (Henderson's Method 3) : méthode 3 de Henderson

PHSC (Paternal half-sib intraclass correlation) : modèle mixé des moindres carrés et du maximum de vraisemblance

B : Bouvillon, G : Génisse, T : taureau ou taurillon

LM, LD ou LT : *longissimus muscle*, *longissimus dorsi*, *longissimus thoracis*

ST : *semitendinosus*

† dépend du mode cuisson

Tableau II : Liste des indices estimés d'héritabilités obtenues par jury de dégustation pour le caractère de tendreté (adapté et actualisé de Burrow *et al.*, 2001)

Héritabilité	Méthode	Race	Nombre d'animaux	Sexe	Muscle	Référence
0,30	PHSC	Shorthorn	N.D.	B	N.D.	Yao et Hiner (1953)
0,28 à 1,19	PHSC	F1 Brahman x Hereford et Hereford	38	B	LD et ST	Cover <i>et al.</i> (1957)
0,00	PHSC	Shorthorn et croisés	100			
0,51	PHSC	Brahman	90	N.D.	LD	Alsmeyer <i>et al.</i> (1958)
1,29	PHSC	Combinés Shorthorn x Brahman	190			
0,23 ± 0,11	PHSC	Hereford x (Angus x Friesian)	646	B et G	LD	Wilson <i>et al.</i> (1976)
0,09 ± 0,19	PHSC	Friesian	218	B	LD	More O'Ferrall <i>et al.</i> (1989)
0,10 ± 0,13	REML	Groupes du programme GPE (Clay Centre)	682	B	LD	Van Vleck <i>et al.</i> (1992)
0,21 ± 0,08	REML	3 races <i>Bos taurus</i> composites	1599	B	LD	Gregory <i>et al.</i> (1994)
0,22 ± 0,08 ^a			1594			
0,12 ± 0,09 ^b	PHSC	Groupes du programme GPE (Clay Centre) (toutes races confondues(a), races pures(b) et (c) races composites)	1153	B	LD	Gregory <i>et al.</i> (1995)
0,51 ± 0,18 ^c			441			
0,08 ± 0,09	HM3	Croisés <i>Bos taurus</i>	392	B et G	LD	Wulf <i>et al.</i> (1996)
0,06 ± 0,07		Groupes du programme GPE (données du Group I)	1431	B et G	LD	
0,03 ± 0,28	REML	Groupes du programme GPE (données du Group II)	237	B et T	LD	Barkhouse <i>et al.</i> (1996)
0,02 ± 0,28		Groupes du programme GPE (données combinés des groupes)	1668	B, T et G	LD	
0,50 ± 0,12	PHSC	Groupes du programme GPE	888	B	LD	Wheeler <i>et al.</i> (1996)

Tableau II (suite)

0,31 ± 0,18	REML	Races <i>Bos taurus</i> et <i>Bos indicus</i> et croisements	575	B et G	LD	O'Connor <i>et al.</i> (1997)
0,31 ± 0,08	REML	Groupes du programme GPE	2386	B	LD	Splan <i>et al.</i> (1998)
0,24 ± 0,12	PHSC	Groupes du programme GPE	854	B	LT	Wheeler <i>et al.</i> (2001)
0,18	REML	Angus, Hereford, Shorthorn et Murray Green	1152	T	LT+LD	Johnston <i>et al.</i> (2003)
0,31		Brahman, Belmont Rouge et Santa Gertrudis	1585			
0,26 ± 0,08	REML	Groupes du programme GPE	2360	B	LD	Nephawe <i>et al.</i> (2004)
0,25 ± 0,19	PHSC	Groupes du programme GPE	568	B	LT	Wheeler <i>et al.</i> (2004)
0,37*	REML	Groupes du Carcass Merit Traits	7179	B et G	LD	Dikeman <i>et al.</i> (2005)
0,50 ± 0,06		Charolais	397			
0,12 ± 0,03	REML	Limousin	440	B	LT	Renand (2006)
0,21 ± 0,05		Blonde d'Aquitaine	361			

* overall tenderness : comprend les différentes qualités organoleptiques (flaveur, jutosité, tendreté)

REML (Restricted Estimated Maximum Likelihood) : maximum de vraisemblance résiduelle

HM3 (Henderson's Method 3) : méthode 3 de Henderson

PHSC (Paternal half-sib intraclass correlation) : modèle mixé des moindres carrés et du maximum de vraisemblance

B : Bouvillon, G : Génisse, T : taureau ou taurillon

LM, LD ou LT : *longissimus muscle*, *longissimus dorsi*, *longissimus thoracis*

ST : *semitendinosus*

cisaillement soit par un jury de dégustation. Les valeurs d'héritabilité obtenues avec la mesure par force de cisaillement sont très variables allant de 0 à 92%. Comme l'ont souligné Wheeler *et al.* (1996), les variations observées sont principalement dues à l'absence de réels protocoles standardisés pour mesurer la force de cisaillement. Cependant, les variations obtenues par un jury de dégustation sont bien plus importantes encore puisque l'héritabilité varie de 0 à 129%, certainement en raison du caractère subjectif de cette approche. Néanmoins, les valeurs moyennes d'héritabilités estimées sont relativement proches indépendamment de la méthode de mesure employée (environ 30% dans le cas de la mesure par force de cisaillement et environ 28% pour la mesure de la tendreté par jury de dégustation). Ces études indiquent qu'il existe bien une base génétique responsable du caractère de tendreté, ce qui autorise à imaginer qu'une amélioration par sélection est possible, étant entendu que les facteurs environnementaux, notamment ceux maîtrisables par l'Homme, jouent également un rôle important dans la détermination de la tendreté de la viande bovine (Miller *et al.*, 1996).

IV.1 QTL et tendreté

Chez le bovin, comme dans toute autre espèce, les caractères présentant une importante variabilité phénotypique et génétique sont en général considérés comme des caractères quantitatifs gouvernés par l'action combinée de nombreux gènes, en nombres variables mais chacun ayant un petit effet, et des effets de l'environnement. La variabilité d'origine génétique est due à des polymorphismes génétiques (aussi appelés mutations) dont l'identification permettrait à la fois de mieux comprendre le déterminisme des caractères et de proposer des procédures pour sélectionner les reproducteurs les plus intéressants. La recherche de ces mutations peut être organisée en plusieurs étapes. Une approche consiste à repérer dans un premier temps les régions chromosomiques portant un ou plusieurs gènes (ou *loci*) impliquées dans le contrôle de ces caractères dits quantitatifs, et dont des formes alléliques seraient responsables de la variabilité. Les *loci* impliqués dans la variation des caractères quantitatifs sont appelés « Loci de Caractères Quantitatifs » et « Quantitative Trait Loci » ou **QTL** en anglais. Ils sont caractérisés par deux paramètres : leur position sur le génome et leur effet sur le caractère cible. Cette première étape se prolonge le plus souvent par un travail supplémentaire dit de cartographie fine qui vise à localiser le QTL dans une région chromosomique aussi petite que possible. La primo-détection fournit des intervalles de localisation de l'ordre de plusieurs dizaines de centiMorgan, qui correspondent à plusieurs dizaines de millions de bases et à plusieurs centaines de gènes, rendant problématique l'identification de gènes candidats. Dans un second temps, la recherche du ou des gènes sous-

jacents aux QTLs peut être entreprise et diverses approches sont employées dans cette étape : elles ont pour objectif, par des méthodes d'analyses structurales et fonctionnelles, de retenir les meilleurs candidats positionnels et fonctionnels dont l'étude approfondie pour identifier des mutations et estimer leurs effets sont à entreprendre ensuite.

Des QTLs pour la tendreté ont été recherchés et répertoriés dans les bases de données internationales. L'analyse de ces QTLs a permis de mettre en avant plusieurs gènes candidats au cours des dernières années.

IV.2 QTL et banques de données

La recherche de QTLs pour le caractère de tendreté de la viande bovine a permis l'identification de différentes régions chromosomiques réparties sur le génome et dont la taille varie selon le QTL considéré. L'ensemble de ces QTLs est répertorié dans des banques de données telles que CattleQTLdb et bovineQTL Viewer (<http://www.animalgenome.org/QTLsdb/cattle.html> ; <http://genomes.sapac.edu.au/bovineqtl/>). Selon les études, pour la détection de ces QTLs, différentes mesures ont été réalisées. Ainsi, en plus des mesures « classiques » de force de cisaillement et par panel de dégustation, certains auteurs ont utilisé l'indice de fragmentation myofibrillaire et/ou la mesure de compression. Aujourd'hui, près d'une vingtaine de QTLs, localisés sur 12 chromosomes, sont répertoriés pour la tendreté et les informations sont récapitulées dans le Tableau III. Je vais à présent préciser et compléter quelques points en examinant la situation pour chacun des chromosomes portant un ou plusieurs QTLs.

Chromosome bovin 2 : Le premier QTL identifié est celui situé sur le chromosome 2 (Casas *et al.*, 1998). Cette région chromosomique correspond en fait au locus du gène de la myostatine, dont la localisation était l'un des deux objectifs de l'étude (l'autre étant l'évaluation des effets de la présence d'une copie du gène muté sur les caractères liés à la carcasse et les caractères de naissance). Cependant, lors de son étude, aucun effet sur la tendreté n'a été constaté pour des animaux ne présentant qu'une seule copie du gène muté. Wheeler *et al.* (2001) ont, quant à eux, montré une amélioration de la tendreté pour des animaux ayant une ou deux copies du gène de la myostatine inactivée(s). Plus récemment,

Tableau III : Liste des QTLs pour le caractère de tendreté disponibles dans les bases de données CattleQTLsdb et Bovine QTLs Viewer (<http://genomes.sapac.edu.au/bovineqtl>; <http://www.animalgenome.org/QTLsdb/cattle.html>)

Chromosome (BTA)	Position (cM)	Marqueurs extrêmes		Animaux	Références	Base de données
2	0	BMC9007*		Descendants ¼ Blanc Bleu Belge et ¼ Piedmontese issus de croisements mâles de race Piedmontese x Angus ou Blanc Bleu Belge x MARC III avec des femelles MARC III	Lines <i>et al.</i> , 2009	CattleQTLsdb
4	3,9-30,6	BL1024	BMS1237	Mêmes animaux que Casas <i>et al.</i> , 1998	Casas <i>et al.</i> , 2001	Bovine QTLs Viewer CattleQTLsdb
5	32-83	AGLA293	DIK5176		Casas <i>et al.</i> , 2000	Bovine QTLs Viewer CattleQTLsdb
	0-6,7	BMS1095	BM6026	Descendants F2 issus de croisements Wagyu x Limousin	Alexander <i>et al.</i> , 2007	CattleQTLsdb
7	116-123,5	ILSTS006	INRA053	Animaux issus de croisements Charolais–Brahman x Rouge Belmont	Davis <i>et al.</i> , 2008	CattleQTLsdb
10	79,1-101,4	BMS2641	BL1134	Descendants F2 issus de croisements Wagyu x Limousin	Alexander <i>et al.</i> , 2007	CattleQTLsdb
	59,3-92,9	INRA071	CSSM46	Animaux issus de croisements Charolais–Brahman x Rouge Belmont	Davis <i>et al.</i> , 2008	CattleQTLsdb
	59,98-77,81	RM888	CSRM60	Animaux F2 issus de croisements d’animaux F1 Charolais x Holstein entre eux ou avec des animaux de race Holstein ou Charolais	Gutierrez-Gil <i>et al.</i> , 2008	CattleQTLsdb
11	92,17-112,5	HUJV174	BMS607		Gutierrez-Gil <i>et al.</i> , 2008	CattleQTLsdb

15	37,962-39,07	HEL1	BMS1782	Descendants issus de croisements de taureaux Brahman-Hereford avec des vaches <i>Bos taurus</i> ou croisés <i>Bos taurus</i>	Keele <i>et al.</i> , 1999	CattleQTLsdb Bovine QTLs Viewer
	31,21-48,21	JAB1	BMS2684	Animaux F2 issus de croisements d'animaux F1 Charolais x Holstein entre eux ou avec des animaux de race Holstein ou Charolais	Gutierrez-Gil <i>et al.</i> , 2008	CattleQTLsdb
18	30,15-42,13	INRA121	HAUT14			
19	15,9-65,7	HEL10	CSSM65			
20	52-75	BMS1719	BMS521	Animaux issus de croisements d'un taureau Hereford x Brahman avec des vaches <i>Bos taurus</i> MARC III ou GPE Cycle IV	Casas <i>et al.</i> , 2003	Bovine QTLs Viewer CattleQTLsdb
25	31,59-53,37	BM737	INRA222	Animaux F2 issus de croisements d'animaux F1 Charolais x Holstein entre eux ou avec des animaux de race Holstein ou Charolais	Gutierrez-Gil <i>et al.</i> , 2008	CattleQTLsdb
29	36,6-54,78	BMS2149	MNB141	Mêmes animaux que Casas <i>et al.</i> , 1998	Casas <i>et al.</i> , 2000, 2003	Bovine QTLs Viewer CattleQTLsdb
	42-52,41	BL1100	BMC6004	Mêmes animaux que Casas <i>et al.</i> , 1998 et 2000		
	40,16-69,73	DIK94	MNB-101	Animaux F2 issus de croisements d'animaux F1 Charolais x Holstein entre eux ou avec des animaux de race Holstein ou Charolais	Gutierrez-Gil <i>et al.</i> , 2008	CattleQTLsdb

* Un seul marqueur est indiqué car le QTL correspond au locus du gène de la myostatine

Lines *et al.* (2009) ont confirmé la présence de ce QTL, par des mesures de compression et de force de cisaillement, dans les 10 premiers centimorgans du chromosome.

– Chromosome bovin 4 : En utilisant le même panel d'animaux, Casas *et al.* (2001) ont permis d'identifier un autre QTL sur le chromosome 4 bovin. De plus, les auteurs ont pu établir une interaction entre ce QTL et le gène de la myostatine. Ainsi, un animal ayant reçu l'allèle de la myostatine inactive d'un animal MARC III présente une plus faible valeur de force de cisaillement qu'un animal ayant reçu cet allèle d'un animal Blanc Bleu Belge. Le phénomène inverse est observé lorsque l'allèle hérité est « actif ».

– Chromosome bovin 5 : Pour compléter l'étude de Wheeler *et al.* (2001), d'autres QTLs ont été recherchés sur des animaux présentant une copie du gène de la myostatine inactivée. Différents QTLs ont ainsi été identifiés pour de nombreux caractères et notamment un QTL, pour le caractère de tendreté à 14 jours *post-mortem*, situé sur le chromosome 5 (Casas *et al.*, 2000). Une interaction a été mise en évidence entre ce locus et le gène de la myostatine situé sur le chromosome 2 : des animaux hétérozygotes pour le gène de la myostatine ayant une part d'Angus donnent une viande pour laquelle la force de cisaillement observée est plus élevée que lorsque la viande est issue d'animaux ayant un héritage de Piedmontaise. Par ailleurs, sur le chromosome 5, 4 SNPs, situés au niveau du locus *NOLI* (nucleolar antigen 1), ont été décrits comme étant associés à la force de cisaillement à 14 jours *post-mortem* ainsi qu'au gain moyen quotidien (Average daily gain, ADG) ou, dans une moindre mesure, au poids à l'abattage (Stone *et al.*, 2005). Enfin, sur ce même chromosome 5, un second QTL a été mis en évidence : il affecte aussi bien la tendreté globale que la fragmentation myofibrillaire. Ce dernier est localisé au début du chromosome (à 0 cM ; Alexander *et al.*, 2007).

– Chromosome bovin 7 : L'équipe de Drinkwater *et al.* (2006) a mis en évidence deux QTLs sur le chromosome 7 : un, dans lequel est retrouvé le gène de la calpastatine (*CAST*), l'inhibiteur des calpaïnes, et l'autre dans lequel est retrouvé le gène de la lysyl oxidase (*LOX*), protéine impliquée dans la formation du tissu conjonctif et plus précisément dans la formation des fibres de collagène et d'élastine. En 2008, Davis *et al.* ont également retrouvé un QTL pour la note de tendreté et la mesure de compression de la viande mais ici il s'agit uniquement du QTL dans lequel le gène de la calpastatine est localisé.

– Chromosome bovin 10 : La première étude relatant l'existence sur ce chromosome d'un QTL affectant la force de cisaillement est celle d'Alexander *et al.* (2007). Par la suite, Davis *et al.* (2008) ont également trouvé un QTL pour la compression sur ce chromosome mais à une position différente. Enfin, Gutiérrez-Gil *et al.* (2008) ont mis en évidence différents QTLs dont un qui affecte la texture de la viande grillée, et situé à une position intermédiaire entre les deux précédents. Il est à noter que l'allèle Charolais montre un bon effet de dominance ($d = -0,37$, $P < 0,001$).

– Chromosome bovin 11 : Gutiérrez-Gil *et al.* (2008) ont mis en évidence deux QTLs sur ce chromosome dont un affecte la dureté de la viande cuite. Pour ce QTL, l'allèle Charolais montre, ici aussi, un bon effet de dominance ($d = -0,39$, $P < 0,001$).

– Chromosome bovin 15 : Keele *et al.* (1999) ont détecté un QTL localisé sur le chromosome 15 dont l'effet sur la force de cisaillement, mesuré à 14 jours après abattage, n'est observé que sur un des quatre groupes d'animaux utilisés pour l'étude. L'hypothèse émise par les auteurs pour expliquer l'absence de détection dans les autres groupes serait liée à l'influence de facteurs environnementaux non identifiés « masquant » l'effet du QTL. Casas *et al.* (2003), sans négliger cette explication, supposent que ce QTL serait un « faux positif ». Plus récemment, Gutiérrez-Gil *et al.* (2008) décrivent la présence d'un QTL dans cette même région qui affecte l'indice de fragmentation des myofibrilles. Cette mesure reflète la dégradation des myofibrilles par protéolyse et les fortes valeurs correspondent à une viande plus tendre. Dans cette étude, les plus fortes valeurs sont associées avec l'allèle Charolais. L'allèle Holstein présente, quant à lui, un effet de dominance. Par ailleurs, la comparaison des cartes de liaison des chromosomes BTA15 et humain 11 a permis d'identifier 4 gènes candidats dans le QTL à savoir le gène codant le facteur de transcription MYOD1, le gène de régulation du taux de calcium intracellulaire *CALCA*, le gène de l'adénylate cyclase *ADCY2* et enfin, le gène du transporteur du glucose-6-phosphate *G6PT1* (Rexroad III *et al.*, 2001).

– Chromosomes bovins 18 et 19 : Sur ces deux chromosomes ont été localisés deux QTLs pour l'indice de fragmentation des myofibrilles. Dans un cas (BTA 18), l'allèle Holstein est associé avec les plus fortes valeurs du caractère et possède un effet de dominance. Dans l'autre cas (BTA 19), c'est l'allèle Charolais qui présente un effet favorable.

– Chromosome bovin 25 : Comme dans le cas du QTL situé sur le chromosome 10, le QTL identifié affecte la texture de la viande grillée. L'étude de Guitierrez-Gil *et al.* (2008) a aussi décelé un très faible effet de l'allèle Charolais ($a = -0,01$) et une dominance de l'allèle Holstein.

– Chromosomes bovins 20 et 29 : L'étude de Casas *et al.* (2000) a permis de définir un QTL putatif pour la force de cisaillement à 3 et 14 jours *post-mortem* sur le chromosome 29. Dans une étude publiée en 2003, ces auteurs ne confirment pas son existence alors qu'ils détectent dans la même région un QTL pour la force de cisaillement mesurée à 14 jours *post-mortem*. Ces mêmes auteurs ont également rapporté la présence sur le chromosome 20 d'un QTL qui affecte la force de cisaillement mesurée à 3 et 14 jours *post-mortem*. Il est à noter que le gène de la μ -calpaïne (*CAPNI*), qui code une protéase qui serait impliquée dans la maturation du muscle en viande et sur lequel je reviendrai ultérieurement, est situé dans la région portant le QTL détecté sur le chromosome 29. De plus, ce gène est localisé près du pic maximum de probabilité de présence du QTL récemment détecté par Guitierrez-Gil *et al.* (2008), pour la mesure de la dureté et de la texture de la viande grillée. Il est situé dans la partie distale du chromosome.

Enfin, un dernier QTL a été trouvé sur le chromosome 8 et affecte l'adhérence qui est une mesure de la facilité avec laquelle le muscle peut être séparé, reflétant ainsi la dureté du tissu conjonctif et donc, du réseau de collagène (Davis *et al.*, 2008).

En résumé, comme l'ont souligné Davis *et al.* en 2008, la plupart des QTLs mis en évidence dans une étude, ne sont pas retrouvés dans d'autres. Plus d'une trentaine d'études ont ainsi été menées pour localiser des QTLs influençant les caractéristiques sensorielles des viandes. Parmi ces études, près d'une dizaine ont permis l'identification de 18 QTLs répartis sur 12 chromosomes bovins. Dans ces études, le nombre d'animaux testés, le type de mesure ainsi que les races diffèrent. Ainsi, en moyenne, environ 430 animaux d'âges et de sexes différents (veaux, génisses, bouvillons ou encore bœufs) ont été utilisés. Les mesures de tendreté ont été réalisées, le plus fréquemment par force de cisaillement avec cependant des méthodologies qui peuvent différer selon les auteurs. De plus, dans certaines études (Davis *et al.*, 2008 ; Gutierrez-Gil *et al.*, 2008), la tendreté a été estimée par jury de dégustation, force de compression ou encore par mesure de l'adhérence du tissu conjonctif. Dans la majorité des

cas, le muscle testé est le *longissimus dorsi*. Enfin, bien que la méthode de détermination des QTLs repose sur la statistique F, le seuil de significativité diffère selon les auteurs ce qui pourrait expliquer l'absence de recouvrement entre ces études. Tout ceci tendrait à montrer qu'il existe un grand nombre de QTLs pour un caractère donné (Mayo, 2004).

IV.3 Gènes candidats

Les scientifiques, parallèlement ou suite à l'identification de QTLs, ont également recherché des gènes impliqués dans le phénomène de tendreté et dont le fonctionnement pourrait expliquer une part de la variabilité observée. Ainsi, chez le bovin, différents gènes candidats ont été mis en évidence. Les paragraphes qui suivent décrivent certains de ces gènes identifiés soit par l'étude de leur polymorphisme soit par des approches différentielles de type transcriptomique ou protéomique. Soulignons, dès à présent que parmi les gènes cités, nombreux sont ceux qui ne sont pas localisés dans des régions portant des QTLs. Ceci illustre les limites de détection par cette approche et incite à mettre en œuvre des démarches complémentaires. Dans la mesure du possible, pour chaque cas traité, un complément d'information concernant les gènes chez d'autres espèces d'intérêt agronomique, dont les espèces ovine et porcine, sera apporté.

– *L'Acyl-Coenzyme A Deshydrogenase (ACAD), membre 8* : le gène *ACAD8* code une protéine appartenant à une famille de flavoenzymes mitochondriales impliquées dans le catabolisme des acides gras et de certains acides aminés. Le huitième membre intervient dans le catabolisme de la valine. Un SNP a été identifié dans la partie 3'-UTR en position 13408. Il s'agit d'une substitution qui permet l'apparition d'un nouveau site de restriction *Hinf I*. Trois génotypes ont ainsi été définis et l'analyse d'association a permis de montrer un effet important de ce SNP sur le gain de poids journalier et la tendreté. L'allèle favorable est l'allèle G et les animaux homozygotes GG possèdent une viande plus tendre. Il convient toutefois de rester prudent car bien que les auteurs indiquent le nombre et les races des animaux testés (178 provenant de 5 races Luxi, Angus, Hereford, Quinchuan et croisés Simmental x Mengollian), ils ne donnent aucune indication sur le type de mesure réalisé pour le caractère de tendreté ni sur le (ou les) muscle(s) testé(s) (Li *et al.*, 2007b). Notons cependant que ce gène est localisé sur le chromosome 15, chromosome sur lequel a été identifié, dans plusieurs études, un QTL pour la tendreté (Keele *et al.*, 1999 ; Gutierrez-Gil *et al.*, 2008). Cependant, la région chromosomique définie n'inclut pas ce gène. Il est possible

que lors de la recherche du QTL sur ce chromosome, le seuil de détection dans cette région n'ait pas été suffisant pour l'inclure dans le QTL (Li *et al.*, 2007b).

Les génomes du porc et du mouton étant en cours de séquençage et d'assemblage, l'identification du gène *ACAD8* n'a pas, pour l'heure, pu être réalisée.

– *L'Homogentisate 1, 2 Dioxygenase (HGD)* : le gène *HGD* code une des 6 enzymes impliquées dans le catabolisme des acides aminés aromatiques phénylalanine et tyrosine. Neuf polymorphismes de type RFLP ont été identifiés dans 224 bœufs de race rouge Chinoise (Zhou *et al.*, 2010). Parmi eux, un polymorphisme (G/A) a été localisé dans le codon stop et 4 autres sont retrouvés aux positions 11205 (A11205G), 29858 (G29858A), 34232 (C34232G) et 42332 (C42332T), respectivement. Ces 4 polymorphismes provoquent un changement d'acide aminé (N/S, R/H, T/S et L/V). Ils ont tous été associés de façon significative à la force de cisaillement. Ainsi, pour le polymorphisme A11205G, l'allèle G et le génotype homozygote GG sont considérés comme favorables et sont associés à une meilleure tendreté. Pour les polymorphismes G29858A, C34232G et C42332T, l'allèle G et le génotype GA, l'allèle C et le génotype CC et l'allèle T et le génotype TT sont considérés comme favorables car associés à de plus faibles valeurs de force de cisaillement, respectivement. Enfin pour le polymorphisme situé dans le codon stop, l'allèle favorable G et le génotype GG sont associés à la tendreté. Il convient toutefois de rester prudent car, bien que les auteurs indiquent le nombre et la race des animaux testés, aucune indication précise n'a été fournie sur le (ou les) muscle(s) testé(s) ni sur la durée de maturation qu'il a (ou qu'ils ont) subi avant la mesure de la force de cisaillement réalisée.

Chez le porc, le gène *HGD* est localisé sur le plus grand chromosome acrocentrique, le chromosome 13. Sur ce dernier, un grand nombre de QTLs ont été identifiés dont certains sont associés aux caractères de qualité de la viande. Un de ces QTLs est associé au caractère de force de cisaillement de la viande (Yu *et al.*, 1999 ; Malek *et al.*, 2001 ; De Koning *et al.*, 2001 ; Yue *et al.*, 2003). Chez le mouton, ce gène n'a pas encore été identifié.

– *La Leptine* : la leptine est une hormone peptidique impliquée notamment dans la régulation des réserves lipidiques de l'organisme, du dépôt de gras ou encore de l'ingestion de nourriture (Buchanan *et al.*, 2002 ; Geary *et al.*, 2003 ; Lagonigro *et al.*, 2003). Comme la teneur en lipides dans la viande est un élément influençant la tendreté, il n'est pas étonnant de retrouver le gène de la leptine associé au phénomène d'attendrissage des viandes. Le gène de

la leptine (LEP) est constitué d'un intron et de deux exons. La partie 5'-UTR est, par ailleurs, très importante. A ce jour, plus d'une cinquantaine de polymorphismes de type SNP ont été identifiés. Parmi ces SNPs, cinq ont été utilisés dans l'étude de Schenkel *et al.* (2005) pour évaluer leurs associations possibles avec des critères de qualité de la viande sur des animaux *Bos taurus* croisés entre plusieurs races (Angus, Charolais, Limousin et Simmental). Trois SNPs sont situés dans la région promotrice et deux dans l'exon 2 du gène (E2JW et E2FB). Une interaction significative entre ces deux derniers a été retrouvée et les résultats montrent une association entre ces deux polymorphismes et la tendreté dans le muscle *longissimus thoracis* à 2, 7, 14 et 21 jours *post-mortem*. En revanche, aucune association n'a pu être établie dans le muscle *semitendinosus*. Dans cette étude, les génotypes E2JW.E2FB les plus défavorables ont été déterminés comme étant AT.TT, les plus favorables AT.CT. Pour E2JW, l'allèle A semble être favorable (l'allèle T étant relativement rare, autour des 4%) mais aucun avantage ne se dégage vraiment pour l'un ou l'autre des allèles du marqueur E2FB (les différences des allèles C – T varient de +0,24 pour la force de cisaillement à 2 jours *post-mortem* à -0,15 pour la force de cisaillement à 14 jours *post-mortem*). Il faut également noter que ce gène, localisé sur le chromosome bovin 4, n'est pas inclus dans la région comportant un QTL pour la tendreté.

Chez les ovins, le gène de la leptine serait impliqué dans le contrôle de la prise de nourriture des brebis (Henry *et al.*, 1999 ; Blache *et al.*, 2000 ; Morrison *et al.*, 2001), mais aucune étude de son effet sur les qualités de la viande n'a été réalisée à ce jour. Cependant, la mise en évidence de polymorphismes ouvre la voie à des recherches sur ce caractère et plus généralement sur les qualités de la viande (Zhou *et al.*, 2009a).

Chez le porc, le gène de la leptine est situé sur le chromosome 18. Comme chez les ovins, l'influence de ce gène sur la prise de nourriture a été rapportée (de Oliveira Peixoto *et al.*, 2006 ; Kennes *et al.*, 2001), mais aucune étude n'a encore été entreprise pour étudier son effet sur le caractère de tendreté.

– L'Hormone de croissance : l'hormone de croissance (GH) est une hormone peptidique qui intervient, entre autre, dans la croissance des cellules chez les vertébrés. Chez le bovin, le polymorphisme provoquant la substitution d'une leucine par une valine en position 146 de la séquence peptidique semble affecter la composition des carcasses (dépôt de gras) ainsi que la qualité du lait (Falaki *et al.*, 1996 ; Taylor *et al.*, 1998 ; Barendse *et al.*, 2006). L'étude de Di Stasio *et al.* (2002) n'a pas montré d'effet des variants alléliques de ce gène sur les différents critères évalués et liés aux caractères de production de la viande. En

2003, cette même équipe a mis en évidence une association entre un polymorphisme de type RFLP situé dans l'intron 3, et le caractère de tendreté, à 11 jours *post-mortem* en race Piémontaise, l'allèle favorable étant l'allèle C (l'effet de substitution et de dominance sont respectivement de $\alpha = -0,65$ kg, $p = 0,05$ et $d = -1,084$ kg, $p = 0,02$). En revanche, l'étude de Costello *et al.* (2007), utilisant ce même polymorphisme, n'a pas montré d'association avec la tendreté. Ceci est peut-être dû au fait que, dans cette étude, la fréquence allélique de l'autre allèle est faible (9,9%).

Chez le porc, l'hormone de croissance influence la croissance des cellules somatiques et diminue le dépôt de gras (Etherton, 2000). Son administration induit une hypertrophie musculaire ou encore un changement de la distribution du type de fibres musculaires (Beermann *et al.*, 1990 ; Ono *et al.*, 1995). Nielsen et Larsen (1991) ont montré que des polymorphismes de type RFLP dans le gène *GH* étaient associés à des variations de la concentration sanguine de l'hormone. Knorr *et al.* (1997) ont noté quant à eux une association entre ces variants et le taux de gras.

Chez le mouton, une relation entre la sécrétion de GH et la composition de la carcasse a été établie entre les animaux présentant une hyperplasie du tissu adipeux dans la région postérieure (stéatopyges) (Carter *et al.*, 1989). L'injection de l'hormone GH chez des brebis gestantes augmente la croissance du fœtus (de Boo *et al.*, 2008). A la différence des bovins et des porcins, le gène ovin *GH* présente un polymorphisme du nombre de copies du gène. Il existe deux « allèles » à ce locus : l'allèle *GHI* avec une seule copie du gène et l'allèle *GH2* avec deux copies (*GH2-N* et *GH2-Z*) (Valinsky *et al.*, 1990 ; Gootwine *et al.*, 1993). Selon le génotype des animaux, une amélioration de la production de lait dans la race de la région de la Montagne de l'Etoile (Serra da Estrela) a été observée (Marques *et al.*, 2006). Cependant, chez cette espèce, comme chez le porc, aucune étude n'a été menée pour vérifier l'impact de ce gène sur la tendreté.

– La Myostatine : la myostatine, autre désignation du produit du gène *GDF8* qui code le facteur de différenciation 8 (« growth differentiation factor 8 »), joue un rôle clé dans la régulation du développement musculaire. Elle inhibe la prolifération et la différenciation des myoblastes, notamment dans les muscles squelettiques lors du développement embryonnaire. Chez le bovin, ce gène est localisé sur le chromosome 2, à 4,8 cM de l'extrémité centromérique, et dans la région portant le QTL détecté pour le caractère de tendreté. Plusieurs mutations décrites dans le gène de la myostatine conduisent à des protéines non fonctionnelles et provoquent un phénotype hypermusclé (caractère culard bien connu des

éleveurs). Les animaux hypermusclés de la race Blanc Bleu Belge portent une délétion de 11 paires de bases, (Grobet *et al.*, 1997 ; Kambadur *et al.*, 1997 ; McPherron et Lee, 1997 ; Bellinge *et al.*, 2005). Ils présentent une augmentation de près de 20% de la masse musculaire (Grobet *et al.*, 1997). La délétion de 11 paires de bases au niveau de la base 821 (ou « del 11 ») conduit à la production d'une protéine tronquée non fonctionnelle du fait de l'apparition prématurée d'un codon stop. En général, les animaux hypermusclés sont considérés comme donnant une viande plus tendre, aussi bien cuite que crue, en raison notamment d'une diminution du taux de collagène total (Ngapo *et al.*, 2002), cependant cette viande contient également moins de gras. Dans la race Limousine, un variant du gène *myostatine* a été mis en évidence mais les animaux présentent des phénotypes moins « sévères » que pour la mutation « del 11 ». Cette mutation correspond au remplacement d'une cytosine par une adénosine en position 282 dans l'exon 1 et conduit à la substitution d'une leucine par une phénylalanine en position 94 de la protéine (F94L ; Sellick *et al.*, 2007). Les animaux homozygotes pour cette mutation présentent une diminution de 15,4% du pic de force par rapport à des animaux non mutés et une différence de 9,8% dans la dureté de compression pour une viande ayant mûri pendant 26 jours, quelque soit l'âge des animaux (Lines *et al.*, 2009). Par ailleurs, cette mutation provoque une hyperplasie plutôt qu'une hypertrophie, contrairement à la mutation « del 11 » qui présente les 2 modifications; la teneur en collagène et le diamètre de la myofibrille ne contribuent pas aux variations observées. Dans l'étude de Wiener *et al.* (2009), un animal de race South Devon homozygote pour la mutation « del 11 » présente une augmentation de la force de cisaillement bien que cela ne soit pas statistiquement significatif. De même, les études de Casas *et al.* (1998), Oliván *et al.* (2004) et Gill *et al.* (2009) n'ont trouvé aucune association entre la tendreté et le génotype. Ces résultats sont en contradiction avec ceux de Wheeler *et al.* (2001) qui indiquent que la viande d'animaux croisés de race Piémontaise, porteurs d'une copie du gène *myostatine* muté de façon ponctuelle, est plus tendre que celle d'animaux « sauvages ».

Chez le porc, différents SNPs ont été mis en évidence pour le gène *GDF8* (Stratil et Kopečný, 1999 ; Cieślak *et al.*, 2003 ; Yu *et al.*, 2007 ; Stinckens *et al.*, 2008). Guimaraes *et al.* (2007) ont établi plusieurs corrélations entre le niveau de transcrits du gène de la myostatine et des caractéristiques de croissance ou de qualité de la viande. Par exemple, des corrélations de 0,13 et -0,36 ont été déterminées pour la tendreté et le persillé.

Chez le mouton Texel, un QTL affectant les caractéristiques de conformation musculaire de la carcasse a été mis en évidence (Laville *et al.*, 2004 ; Walling *et al.*, 2004 ; Johnson *et al.*, 2005a, b). Ce QTL est localisé dans une région qui comporte le gène *GDF8*.

La mutation la plus remarquable est la substitution G en A localisée dans la région 3'-UTR en position 6723. Cette transition génère un site cible pour 2 micro-ARNs (*mir1* et *mir206*) qui vont inhiber la traduction de la myostatine (Clop *et al.*, 2006). En diminuant la quantité de protéine, ces 2 micro-ARNs provoquent un développement musculaire plus important pour la race Texel.

Chez le poulet et la chèvre, différents SNPs ont été identifiés (Gu *et al.*, 2002 ; Li *et al.*, 2006). Chez le poulet, 3 SNPs sont localisés dans la région 5' en positions 304, 322 et 334 (G304A, A322G et C334T) et deux autres dans la partie 3' en positions 6935 et 7263 (A7263T et A6935G). Dans l'étude de Li *et al.* (2006), à partir de 17 races locales chinoises caprines, 8 SNPs ont été identifiés ; un seul étant situé dans l'exon 2, les autres étant positionnés dans l'exon 3. Leurs effets sur la tendreté n'ont pas encore été mesurés.

– La Lysyl oxidase : Un brevet a été déposé sur des marqueurs génétiques pour le caractère de tendreté (Barendse, 2002). L'un de ces marqueurs correspond à un polymorphisme du gène *LOX*. Ce gène est situé sur le chromosome bovin 7, dans une région flanquant un QTL pour la tendreté (Drinkwater *et al.*, 2006). La lysyl oxidase est une enzyme qui intervient dans la formation de ponts entre les fibres de collagène du tissu conjonctif. Le tissu conjonctif est un élément intervenant dans la détermination de la tendreté, il est logique de penser que toute mutation modifiant l'activité de cette protéine aura pour conséquence de modifier également le nombre de liaisons entre les fibres et influencera ainsi les caractéristiques de la viande. Plus il y aura de liaisons formées entre les fibres, plus la viande sera dure. Dans le brevet, l'auteur relate une association entre un polymorphisme de type RFLP, détecté à l'aide de l'endonucléase *Hinfl*, et la tendreté (via les mesures de l'adhésion et de la compression du muscle *semitendinosus*). Cependant, ceci n'a jamais été, depuis, confirmé par d'autres études.

Chez le mouton comme chez le porc, ce gène n'a pas encore été localisé de manière précise.

– La Calpastatine : le gène *CAST* code la calpastatine qui est l'inhibiteur des calpaïnes, protéines impliquées dans la maturation *post-mortem* du muscle en viande. Des marqueurs génétiques de ce gène sont intégrés dans le brevet déposé par Barendse (2002). Le gène *CAST* est localisé sur le chromosome 7 bovin (Bishop *et al.*, 1993 ; Gu *et al.*, 2000), dans la région où a été défini un QTL pour la tendreté (Drinkwater *et al.*, 2006). Chez le

bovin, ce gène est constitué de 35 exons répartis sur environ 135 kbp. Initialement, différents polymorphismes de type RFLP ont été identifiés mais aucune association avec la tendreté n'avait été établie (Bishop *et al.*, 1993 ; Lonergan *et al.*, 1995). Par la suite, des polymorphismes de type SNP ont été identifiés. Un SNP, situé en position 2959 dans la région 3'-UTR et provoque la transition d'une guanidine en adénine. L'allèle T et le génotype homozygote TT sont considérés comme favorables et ils sont associés à une meilleure tendreté aussi bien chez les animaux *Bos taurus* et *Bos indicus* ou les animaux croisés (Casas *et al.*, 2006 ; Morris *et al.* 2006 ; Schenkel *et al.*, 2006 ; Smith *et al.*, 2009).

Il faut également noter que ce SNP est inclus dans un test commercial GeneSTAR® Tenderness, appelé aujourd'hui GeneSTAR® MPV, qui a fait l'objet d'une validation (Van Eenennaam *et al.*, 2007). Le test GeneSTAR® MPV est le premier test commercial disponible pour l'industrie de la viande bovine. Ce test utilise 4 marqueurs d'ADN indépendants dans leurs effets mais cumulatifs pour leur effet global sur la tendreté.

Dans l'étude de Corva *et al.* (2007), un polymorphisme de type RFLP a été identifié dans la partie 3'-UTR du gène. Il ne semble pas associé à la tendreté chez des animaux *Bos taurus*. Selon les auteurs, ceci pourrait être dû au manque de déséquilibre de liaison entre le marqueur et une éventuelle mutation causale, ou bien au fait que la mesure de tendreté ait été réalisée sur des muscles n'ayant pas (ou peu) subi de maturation *post-mortem*.

Chez le porc, le gène *CAST* est situé sur le bras long du chromosome 2, dans une région où Rohrer *et al.* (2006) ont mis en évidence la présence de deux QTLs pour la force de cisaillement (« slice shear force ») et la réflectance de la couleur verte dans une population Duroc-Landrace. Meyers *et al.* (2007) ont ensuite identifié deux QTLs sur ce même chromosome, pour la force de cisaillement et la tendreté notée par un panel de dégustation, dans une population Berkshire-Duroc. Un de ces deux QTLs est localisé à la même position que le gène *CAST*. Comme chez le bovin, différents marqueurs de type SNP ont également permis de mettre en évidence une association avec la tendreté et ce, dans différentes races (Ciobanu *et al.*, 2004 ; Meyers *et al.*, 2007 ; Lindholm-Perry *et al.*, 2009).

En revanche, chez le mouton, bien que ce gène présente également un polymorphisme (notamment avec une mutation non-synonyme changeant l'acide aminé Q en L, Zhou *et al.*, 2007b), aucune association avec la tendreté n'a été rapportée (Zhou *et al.*, 2008b ; Bickerstaffe *et al.*, 2008).

– Les Calpaïnes : les calpaïnes sont des protéases calcium-dépendant impliquées dans la maturation *post-mortem* du muscle en viande. Trois calpaïnes ont été identifiées chez le bovin, la micro-calpaïne (μ -calpaïne), la milli-calpaïne (m-calpaïne) et p94 (calpaïne 3 ou calpaïne spécifique du muscle). Elles sont codées respectivement par les gènes *CAPN1*, *CAPN2* et *CAPN3*.

Calpaïne 1 : Le premier gène, *CAPN1*, est localisé sur le chromosome bovin 29 sur lequel a été détecté un QTL pour la tendreté (Smith *et al.*, 2000). A ce jour, il existe plus de 100 SNPs référencés pour ce gène. Deux d'entre eux provoquent un changement d'acide aminé : l'un dans l'exon 14 qui entraîne la substitution d'un résidu Alanine par une Glycine en position 316, et l'autre dans l'exon 9, qui correspond au remplacement d'une Valine par une Isoleucine en position 530. Ces 2 SNPs ont été associés à une diminution de la force de cisaillement chez des animaux *Bos taurus* et croisés à 14 jours *post-mortem* (Page *et al.*, 2002, 2004) et sur des muscles n'ayant pas ou peu subi de maturation (Corva *et al.*, 2007). Par contre, Casas *et al.* (2005) ont montré que chez les animaux *Bos indicus*, les marqueurs 316 et 530 ne sont pas en ségrégation (seuls des individus homozygotes ont été retrouvés dans la population testée). De plus, dans l'étude de White *et al.* (2005), aucune association avec la tendreté n'a été retrouvée pour le marqueur 530 sur des animaux *Bos taurus*, *Bos indicus* ou croisés provenant du cycle 8 du Germplam Evaluation (GPE). Ces deux SNPs ne semblent donc pas constituer de bons marqueurs pour des animaux *Bos indicus*. Ceci est en contradiction avec l'étude de Morris *et al.* (2006) qui a montré que le marqueur 530 était associé à la tendreté chez des animaux *Bos taurus*, *Bos indicus* ou croisés. Enfin l'étude plus récente de Costello *et al.* (2007), menée sur des animaux irlandais âgés de 22 à 28 mois, a montré qu'il existait une association entre les génotypes du marqueur 530 et la tendreté à 14 jours *post-mortem* mais aucune association n'a été trouvée avec le marqueur 316. En résumé, l'ensemble de ces études a permis de définir l'allèle C du marqueur 530 comme étant l'allèle favorable aussi bien pour les animaux *Bos taurus* que pour des animaux *Bos indicus*.

L'un des objectifs de l'étude de White *et al.* (2005) était de trouver de nouveaux marqueurs pour des animaux *Bos indicus* (Brahman) et si possible pour des animaux *Bos taurus*. Ainsi, 3 polymorphismes de type SNP ont été identifiés mais 2 d'entre eux ne sont pas polymorphes chez des animaux *Bos taurus*. En revanche, le marqueur 4751 est associé à la tendreté à 14 jours *post-mortem* aussi bien chez des animaux *Bos taurus* que des animaux *Bos indicus* et même pour des individus croisés. Le génotype favorable est CT avec l'allèle favorable C pour le caractère de tendreté. De même, ce marqueur semble avoir un effet favorable sur la tendreté (également mesurée à 14 jours *post-mortem*) chez des animaux de la race rustique brésilienne

Nellore (*Bos indicus*) ou croisés *Bos taurus* (Curi *et al.*, 2009). L'étude de Smith *et al.* (2009) a montré que chez les animaux Brahman, le marqueur 316 est associé à la force de cisaillement à 14 jours mais pas à 7 jours. Le marqueur 4751 est, quant à lui, faiblement associé à la tendreté à 7 et 14 jours *post-mortem*. Ces deux marqueurs 316 et 4751 sont utilisés dans les tests IgenityTenderGENE[®] et GeneSTAR[®] MPV qui sont aujourd'hui commercialisés et proposés pour identifier les animaux susceptibles de produire les viandes les plus tendres.

Chez le porc, *CAPNI* présente du polymorphisme mais aucune association avec la tendreté n'a été déterminée (Yang *et al.*, 2007, 2008 abstracts).

Casas *et al.* (2006) ont évalué l'effet des deux *loci* *CAST* et *CAPNI* sur la tendreté de la viande à 14 jours *post-mortem*, en se basant sur le marqueur 4751 pour *CAPNI* et sur un polymorphisme situé en position 2959 dans la région 3'-UTR du gène *CAST*. Sur les animaux du cycle 8 du GPE, il a été conclu que les animaux possédant le génotype CC du gène *CAST* produisaient une viande moins dure quand ils héritaient également du génotype CC de gène *CAPNI*. Barendse *et al.* (2007) ont cherché à déterminer quelle était l'interaction d'un gène sur l'autre, c'est-à-dire leur relation d'épistasie. Dans cette étude, ces auteurs ont également recherché les mutations causales sur la tendreté de la viande. Il apparaît que le SNP *CAST*:c.155C>T (transition de la base C en T en position 155), qui modifie l'acide aminé proline 52 en leucine, présente la plus forte association avec la tendreté. Pour le gène *CAPNI*, aucun des différents SNPs identifiés ne se démarque par un effet particulier sur la tendreté. Les différents génotypes observés des gènes *CAST* et *CAPNI* montrent une forte épistasie pour les quatre races testées avec majoritairement des effets de type additif x dominant (70% des composants sont *ad + da*) signifiant que l'effet dominant à un locus (c'est-à-dire l'interaction entre les allèles d'un même locus) est modifié par l'effet additif à l'autre locus.

Calpaïne 2 : Le gène *CAPN2* est constitué de 19 exons. Un polymorphisme de type RFLP a été trouvé dans la séquence codant la région régulatrice de la protéine. Ce polymorphisme a permis de définir 3 génotypes (AA, AB et BB). Cependant les seules études menées pour évaluer l'effet de ce polymorphisme sur la tendreté n'ont révélé aucune association (Zhang *et al.* 1996 ; Costello *et al.*, 2007).

Calpaïne 3 : Le gène *CAPN3* est situé sur le chromosome 10 dans la région où un QTL pour la tendreté a été détecté. Le but de l'étude de Barendse *et al.* (2008) était de découvrir des

polymorphismes dans ce gène et d'évaluer leurs effets sur la tendreté dans différentes races. Parmi les différents SNPs trouvés, 3 ont été analysés pour leur effet sur la tendreté et une association significative a été déterminée dans les races Brahman et Belmont rouge mais pas dans la race Santa Gertrudis. Ainsi, le génotype GG du SNP c.1538+225G>T présente l'effet le plus important pour ce caractère avec un effet additif de $a = -0,147$ kg ($P_a = 0,026$) et un effet de substitution de $\alpha = 0,169$ kg ($P_\alpha = 0,003$) pour la race Brahman.

Chez le mouton, le gène *CAPN3* est polymorphe (Zhou *et al.*, 2007a) et une association a été décrite entre l'un des SNPs et le poids à la naissance (Chung *et al.*, 2007). En revanche, aucune association n'a pu être déterminée avec la tendreté (Zhou *et al.*, 2009b). Ceci est peut-être dû au fait que seuls 3 SNPs, situés dans l'exon 10, ont été utilisés pour l'étude.

Chez le porc, des polymorphismes dans le gène *CAPN3* ont été identifiés mais aucune étude n'a été menée pour analyser leur effet sur la tendreté (Larsen *et al.*, 1998).

En résumé, près d'une dizaine de gènes ont été identifiés comme impliqués dans le phénomène de tendreté. Ces gènes ont été mis en évidence par l'étude de leur polymorphisme de type RFLP ou SNP. Cependant, du fait du faible nombre d'études menées sur ces gènes candidats, très peu ont permis l'élaboration d'outils permettant une sélection des animaux qui donneraient la viande la plus tendre. Ainsi, parmi les gènes candidats et les marqueurs qui ont été identifiés, seuls 3 ont fait l'objet d'un dépôt de brevet (*DNAJAI*, *CAST*, *LOX*) et trois ont permis le développement de deux outils commerciaux pour les professionnels de la filière secteur anglo-saxone, les tests multi-marqueurs GeneSTAR[®] MPV et IgenityTenderGENE[®]. Il reste donc un important travail à mener pour essayer de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors de l'attendrissage et ainsi définir de nouveaux gènes candidats et de nouveaux marqueurs qui serviront à la sélection.

En parallèle de l'identification de marqueurs génétiques, un important effort est réalisé sur l'identification de marqueurs dits biologiques. Un marqueur biologique est une caractéristique de l'expression d'un gène, observée au niveau des transcrits ou des protéines et associée à une particularité du phénotype. L'identification de marqueurs biologiques passe donc par l'étude des ARN messagers ou transcrits (transcriptome) et des protéines (protéome) d'un tissu ou d'une cellule et qui dans notre cas correspond au tissu musculaire. Finalement, le développement de ces analyses de transcriptomique ou de protéomique constitue une démarche de criblage afin de repérer les gènes influençant la mise en place des phénotypes

d'intérêt pour les producteurs ou les consommateurs. L'analyse du transcriptome se révèle être une approche intéressante dans l'identification de gènes potentiellement impliqués dans l'attendrissage des viandes. En effet, elle permet d'observer non pas un seul gène mais d'évaluer de manière globale l'ensemble des transcrits qui pourraient être différentiellement exprimés dans des muscles de tendreté différente. Cette approche peut non seulement révéler un ou plusieurs gènes d'intérêt mais elle conduit également à dégager des mécanismes ou des voies métaboliques qui seraient impliqués, permettant une meilleure compréhension du phénomène. Il est tout de même important de souligner qu'une étude transcriptionnelle ne reflète pas obligatoirement l'expression au niveau protéique. Les deux démarches sont donc généralement complémentaires. Pour le caractère de tendreté de la viande, au moins deux études ont été menées en suivant ce type de démarche.

– L'Homologue à DnaJ (Hsp40), sous-famille A, membre 1 : Bernard *et al.* (2007) ont cherché à identifier de nouveaux marqueurs moléculaires pour les qualités sensorielles de la viande (jutosité, tendreté et flaveur). Ainsi, par l'analyse transcriptomique du muscle *longissimus thoracis* de taurillons Charolais, 42 gènes se sont révélés être différentiellement exprimés pour ces 3 qualités. Parmi ces gènes, 9 sont sous-exprimés ; le gène *DNAJ1* est considéré comme particulièrement intéressant car une forte corrélation négative entre son niveau d'expression et la tendreté a été observée ($r = -0,66$). Ce résultat a fait l'objet d'un dépôt de brevet (Bernard *et al.* 2007 ; Patent Application PCT/EP2007/059585). Cependant, cette observation est à confirmer car la corrélation relevée a été déterminée en étudiant un petit nombre d'animaux (14 animaux) et la situation mérite donc d'être examinée sur un nombre plus important d'animaux, dans différentes races, ainsi que sur d'autres muscles. La protéine codée par le gène *DNAJ1* appartient à la famille des protéines de choc thermique de 40 kDa ou Hsp40. C'est une protéine chaperonne qui, associée à la protéine de choc thermique de 70 kDa (Hsp70), permet d'inhiber l'apoptose, mécanisme qui semble intervenir lors de la maturation *post-mortem* du muscle en viande (Herrera-Mendez *et al.*, 2006). A l'instar du gène *ACAD8*, le gène *DNAJ1* n'a pas encore été identifié chez le mouton ou le porc bien que dans cette dernière espèce, d'autres membres de la famille des Hsp40 aient été identifiés.

Une autre étude (Kee *et al.*, 2008) a été menée sur 10 animaux de race Hanwoo (*Bos taurus*). Ces auteurs ont montré que le niveau d'expression de 70 gènes (sur 7991 testés) était corrélé avec la force de cisaillement. Une analyse de ces gènes a ensuite été entreprise et a

permis de les regrouper selon leur fonction. Ainsi, par exemple, certains gènes sont impliqués dans le métabolisme des protéines ou encore dans la signalisation cellulaire. Les gènes de ce groupe présentent une forte corrélation négative avec la force de cisaillement (donc la dureté de la viande). A l'inverse, les gènes impliqués dans le métabolisme énergétique ou le métabolisme des acides gras sont eux corrélés positivement ($|r| \geq 0,80$). Il faut rester prudent ; un plus grand nombre d'animaux doit être testé pour confirmer la relation entre la variation des niveaux d'expression des transcrits et celle de la tendreté. Dans les deux études, les mesures de tendreté ont été réalisées suivant des méthodes différentes. L'étude réalisée par Kee *et al.* (2008) a été effectuée sur le muscle *longissimus dorsi* après seulement une nuit de maturation à 4°C et sur un échantillon de viande d'abord testé pour la perte en eau à la cuisson puis maintenue à une température interne de 70°C dans un bain-marie, avant de réaliser la mesure de la force de cisaillement. Dans l'étude de Bernard *et al.* (2007), les mesures ont été faites à 14 jours *post-mortem* sur un échantillon utilisé uniquement à cette fin.

L'analyse protéomique est une approche complémentaire à l'analyse transcriptomique et constitue le second volet de la génomique fonctionnelle. La protéomique est une science récente qui étudie des ensembles de protéines synthétisées par une cellule, leurs rôles, leurs structures, leurs localisations et leurs interactions. L'analyse protéomique permet de faire l'inventaire des protéines présentes dans une cellule ou dans un compartiment cellulaire ou encore un tissu dans des conditions données. Alors que le génome d'une cellule est constant, son protéome varie et reflète l'état et le fonctionnement de la cellule. En quelque sorte, il constitue une photographie de la cellule à un instant donné. Le protéome se distingue d'un autre autant par la variation de quantité d'une protéine donnée que par la présence ou l'absence de certaines protéines ou de leurs isoformes. L'analyse protéomique permet donc de réaliser un suivi de l'évolution des protéines au cours de la maturation (Bendixen, 2005). Dans le paragraphe qui suit, je vais rapporter quelques résultats obtenus par cette approche.

Sawdy *et al.* (2004) ont noté, par l'analyse du protéome de muscle *longissimus dorsi* à 36 heures *post-mortem*, une variation d'intensité dans 7 bandes qui sont corrélées positivement avec la tendreté à 7 jours. Parmi ces bandes, deux ont été identifiées comme étant des fragments de myosine. L'équipe de Bouley *et al.* (2004) a étudié le protéome de muscles *semitendinosus* de taurillons de trois races bovines (Charolaise, Limousine et Salers) qui ont été classés en fonction de leur niveau de tendreté par un jury de dégustation. Cela a permis de montrer une différence d'expression pour 10 protéines, parmi lesquelles 6 sont des

protéines de l'appareil contractile, 1 est impliquée dans la voie métabolique du calcium, 1 dans la glycolyse et la dernière est une protéine de stress. De plus, entre les races à viande, 4 protéines sont communes alors qu'une seule protéine l'est entre la race à viande Charolaise et la race rustique Salers. Morzel *et al.* (2008) ont montré, sur le muscle *longissimus thoracis* issus de taurillons de race Blonde d'Aquitaine, que la quantité de succinate déshydrogénase, une enzyme du métabolisme oxydatif, était le meilleur prédicteur de la tendreté globale et initiale de la viande, et qu'à elle seule, elle pouvait expliquer respectivement 58% et 66% de la variation dans la tendreté initiale et globale. De plus, les taux de HSP27 dans le muscle frais et les fragments de HSP 27 dans le muscle maturant expliquent jusqu'à 91% de la variabilité de la tendreté. Par ailleurs, la comparaison des protéomes à 1 heure et 14 jours *post-mortem* a montré une variation de la quantité de certaines protéines structurales et chaperonnes. Jia *et al.* (2006a) ont effectué une comparaison de profils protéomiques sur les muscles *semitendinosus* (ST) et *longissimus dorsi* (LD) de bouvillons Hostein Friesian. Ils ont comparé leurs profils protéiques au moment de l'abattage et après 24 heures *post-mortem*. Ainsi, 13 protéines ont été identifiées dans le muscle LD et 18 dans le muscle ST. Parmi les protéines identifiées, on retrouve des protéines structurales, myofibrillaires, des enzymes métaboliques et des protéines de stress. Cette même équipe (Jia *et al.*, 2006b) a par ailleurs démontré une évolution de la quantité de certaines enzymes métaboliques dans le muscle *longissimus dorsi* avant et après la mort de l'animal. Il ressort ainsi une augmentation de certaines enzymes de la glycolyse et du cycle de Krebs dans les quelques heures qui suivent la mort de l'animal. De même, une forte augmentation des protéines de stress est constatée. Peu après, ces mêmes auteurs (Jia *et al.*, 2007) ont analysé les protéomes de muscle *longissimus thoracis* issus de taurillons de race Rouge Norvégienne pendant les 24 heures suivant l'abattage. L'analyse protéomique a permis de détecter 39 protéines dont le taux varie au cours des 24 premières heures *post-mortem*. Ils ont pu classer ces protéines en 5 groupes : les enzymes métaboliques, les protéines de stress et de défense, les protéines structurales, une enzyme protéolytique et un groupe « divers » contenant entre autre des facteurs de transcription. L'équipe de Kim *et al.* (2008) a, quant à elle, identifié 4 protéines dans le muscle *longissimus dorsi* différenciellement exprimées entre des animaux présentant des différences de caractéristiques bouchères (couleur, capacité de rétention d'eau, teneur en gras intramusculaire) et de force de cisaillement. Parmi ces 4 protéines, 2 sont des protéines chaperonnes (TCP-1 et HSP27), 1 est une protéine myofibrillaire (l'actine alpha) et la dernière est impliquée dans la voie de régulation du calcium (IP3R1). Par ailleurs, HSP27 et IP3R1 se sont révélées être corrélées négativement avec la tendreté. Enfin, très récemment,

l'équipe de Zapata *et al.* (2009) a réalisé une analyse protéomique de fractions myofibrillaires de muscles *longissimus dorsi* issus de 22 bouvillons croisés Angus. Une partie du muscle a été conservée 36 heures *post-mortem* pour permettre l'analyse et l'autre partie a été utilisée pour réaliser la mesure de la tendreté à 72 heures et 14 jours *post-mortem* par force de cisaillement. L'analyse différentielle, menée entre les échantillons les plus tendres et les moins tendres à 72 heures et 14 jours *post-mortem* ainsi qu'entre des échantillons présentant une différence de tendreté durant cette période, a révélé des taux différents pour certaines protéines structurales, myofibrillaires, de stress et d'enzymes métaboliques.

Ainsi, l'ensemble de ces différentes analyses protéomiques, bien qu'ayant été réalisées par différentes équipes sur différents animaux issus de différentes races, montre que certaines protéines et/ou catégories de protéines sont communes, comme par exemple les protéines myofibrillaires, les protéines structurales ou les protéines de stress. Cette redondance permet à l'analyse protéomique, mise en place récemment, d'offrir de nouvelles perspectives dans la compréhension des mécanismes mis en jeu lors de la maturation, par l'étude d'un grand nombre de profils de muscles bovins. Ainsi, ceci permettra la découverte de nouveaux marqueurs biologiques en relation avec la tendreté autorisant une meilleure maîtrise de ce caractère lors de l'élevage et de la sélection des animaux.

IV.4 Notions d'eQTL et de pQTL

Il existe une « extension » de la notion de QTL qui est appelée eQTL (expression Quantitative Trait Loci). A l'instar du QTL, le Locus de Caractères Quantitatifs d'Expression est une région qui permet d'identifier une variation génomique pouvant potentiellement expliquer certains caractères observés. La différence entre le QTL et l'eQTL est qu'une région eQTL contrôle la variabilité d'expression d'un gène ou d'un groupe de gènes qui lui sont liés. Si certaines régions QTLs et eQTLs, identifiées dans un seul et même dispositif, sont co-localisées, il est possible que le gène responsable des variations phénotypiques pour le caractère d'intérêt soit aussi responsable de la variation d'expression des gènes reliés à la région eQTL. Le recours à une telle stratégie « eQTL » a pour but de tenter de mieux caractériser sur le plan fonctionnel les régions QTLs responsables de la variabilité d'un caractère quantitatif, ce qui permet ainsi d'avoir de solides hypothèses quant au gène causal sous-jacent. Par ailleurs, dans l'approche de type QTL, on ne se focalise que sur un petit nombre de caractères. Dans l'identification de l'eQTL, ce nombre peut être fortement augmenté puisque l'on peut s'intéresser à des centaines de caractères, c'est-à-dire à l'étude de

l'expression de centaines de gènes, cette approche débouchant sur la découverte d'autant de QTLs. Une démarche analogue, concernant l'étude de l'expression au niveau protéique, peut s'envisager. Elle aboutirait à la situation de pQTL. Il est logique de penser que la découverte de tels QTLs, influençant fortement un caractère donné, serait prise en compte dans les travaux visant à identifier les gènes responsables de la variabilité de la tendreté.

Comme nous l'avons vu, différents gènes se sont trouvés être associés avec la tendreté de la viande. Cependant, parmi ceux-ci, seules les calpaïnes et son inhibiteur, la calpastatine, constituent un système protéolytique qui a été très étudié. En effet, la maturation *post-mortem* du muscle en viande correspond à une protéolyse ménagée impliquant des systèmes protéolytiques. Dans la seconde partie de cet exposé bibliographique, je vais donc aborder la maturation de la viande sous son aspect enzymatique.

V. Activités protéolytiques et modifications *post-mortem* du muscle

La maturation *post-mortem* du muscle en viande est un processus enzymatique qui conduit à la dégradation, par des protéases, des structures myofibrillaires, et, dans une moindre mesure, des collagènes présents dans le tissu conjonctif. Ainsi, lors de la transformation *post-mortem* du muscle en viande, des enzymes protéolytiques endogènes vont cliver les liaisons peptidiques des protéines contractiles musculaires et structurales, conduisant ainsi à la déstructuration de la structure myofibrillaire. C'est donc la cinétique de protéolyse qui va conditionner l'attendrissage de la viande et par suite sa tendreté (Ouali, 1992 ; Taylor *et al.*, 1995a). Selon Koohmaraie (1992a), pour qu'une protéase soit un candidat à prendre en compte lors de la protéolyse *post-mortem*, elle doit répondre à certains critères. Elle doit notamment être présente dans la cellule musculaire et être au contact du substrat, les différentes structures myofibrillaires notamment. De plus, cette protéase doit pouvoir hydrolyser, *in vitro*, les protéines dégradées lors de la maturation *post-mortem*. Cependant, les scientifiques « spécialistes de la viande » n'ont pas testé l'influence de chacune des protéases sur l'attendrissage des viandes. Ces protéases sont ubiquitaires dans le monde vivant et jouent des rôles essentiels dans différents processus intracellulaires et extracellulaires. Elles sont impliquées notamment dans la régulation des voies physiologiques, telles que la dégradation par le protéasome des protéines mal repliées, la coagulation sanguine, la maturation protéolytique des précurseurs polypeptidiques, le contrôle de l'apoptose, la défense immunitaire ou encore le clivage du peptide signal. Les enzymes qui possèdent une activité exoprotéasique, permettant l'hydrolyse des protéines par élimination des acides aminés à partir de leurs extrémités N- ou C-terminale, sont appelées peptidases. Celles qui hydrolysent la liaison peptidique, au niveau de sites spécifiques internes, sont désignées sous le nom de protéinases. De façon exceptionnelle, certaines d'entre elles présentent ces deux activités.

V.1 Les exoprotéases

Parmi les protéases possédant une activité exoprotéasique, on retrouve les carboxypeptidases, les aminopeptidases, les dipeptidases et les dipeptidylpeptidases.

V.1.1 Les carboxypeptidases

Elles nécessitent la présence d'une charge négative au voisinage de la liaison peptidique à cliver. Deux carboxypeptidases, les cathepsines A et B, sont présentes dans le muscle squelettique. Ce sont des métalloprotéases à ion zinc. La cathepsine A clive tous les

résidus à l'extrémité C-terminale à l'exception de l'arginine, la lysine et la proline. La cathepsine B, quant à elle, libère surtout les résidus C-terminaux de la lysine et de l'arginine.

V.1.2 Les aminopeptidases

Les aminopeptidases sont des protéases qui nécessitent la présence d'une charge positive au voisinage de la liaison peptidique à cliver. Elles agissent donc à l'extrémité N-terminale de la protéine. Elles sont divisées en deux classes, les leucine-aminopeptidases et les arylamidases. Ces deux classes sont des métalloprotéases à ion zinc. Les leucine-aminopeptidases sont capables de cliver tous les résidus N-terminaux en dehors de la lysine et de l'arginine. Les arylamidases clivent, quant à elles, tous les résidus.

V.1.3 Les dipeptidases

Les dipeptidases sont des métalloprotéases qui requièrent à la fois la présence de deux charges positive et négative. Elles hydrolysent leur cible en dipeptide dans le cytosol des cellules de mammifères. Différentes dipeptidases telles que la prolyl dipeptidase, la prolinase, la glycylléucine dipeptidase ou encore la glycyglycine dipeptidase ont été identifiées et sont regroupées dans la base de données MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>) sous une seule entité appelée carnosine dipeptidase II.

V.1.4 Les dipeptidylpeptidases

Les dipeptidylpeptidases constituent une catégorie d'enzymes intermédiaire entre les exoprotéases et endoprotéases. Elles libèrent un dipeptide à l'extrémité N-terminale de la protéine cible. Dans le muscle, 4 dipeptidylpeptidases (I à IV) sont présentes. La dipeptidylpeptidase I est une protéase à cystéine aussi connue sous le nom de cathepsine C (ou J). Tandis que les dipeptidylpeptidases II et IV sont des protéases à sérine, la dipeptidylpeptidase III est une métalloprotéase à ion zinc.

Bien que présentes au sein du tissu musculaire, les exoprotéases, ou peptidases, jouent un rôle très limité dans la transformation du muscle en viande.

V.2 Les endoprotéases

Certaines protéinases existent au sein du muscle squelettique et constituent une classe d'enzymes jouant un rôle majeur dans la protéolyse *post-mortem*. Dans la partie suivante, je vais donc présenter les principales protéinases existantes au sein du muscle squelettique et leur implication potentielle dans la transformation du muscle en viande.

V.2.1 Le protéasome

Le protéasome est un complexe protéique ubiquiste de grande taille responsable de la dégradation des protéines intracellulaires. Il est présent chez les archées, chez quelques bactéries, jusqu'aux eucaryotes où il joue un rôle essentiel. Les protéines à « éliminer » sont couplées à une chaîne d'au minimum 4 molécules d'ubiquitine qui servent de signal d'adressage au protéasome. Cette dégradation nécessite une importante quantité d'ATP, jusqu'à 300 à 400 molécules d'ATP par protéine dégradée. Le protéasome est constitué de deux sous-complexes : un « cœur », appelé protéasome 20S, possédant l'activité catalytique et un ou deux complexes régulateurs 19S (connus sous le nom de PA700 en raison de leur masse moléculaire voisine de 700 kDa) lié(s) au « cœur ». L'ensemble constitue le protéasome 26S d'environ 2,5 MDa à activité multicatalytique (DeMartino et Gillette, 2007). Le protéasome 20S est un cylindre creux de 15 nm de long et 11 nm de diamètre extérieur et 1,2 à 1,5 nm de diamètre intérieur. Sa masse est d'environ 750 kDa. Il est formé de 2 anneaux externes α et 2 anneaux internes β (figure 2). Chaque anneau est constitué de 7 sous-unités différentes α ou β (d'une taille de 20 à 35 kDa). Ainsi, la structure se décompose en α_{1-7} β_{1-7} β_{1-7} α_{1-7} (Baumeister *et al.*, 1998). Seules les sous-unités β_1 , β_2 et β_5 possèdent un site catalytique. Le cœur du protéasome présente 6 sites protéolytiques portés par les sous-unités β_1 , β_2 et β_5 . La sous-unité β_1 possède une activité « caspase-like », la sous-unité β_2 présente une activité « trypsin-like » et, enfin, la sous-unité β_5 une activité « chymotrypsin-like ». Les protéines cibles vont être dégradées en peptides de 3 à 15 résidus. Ces sites sont situés à l'intérieur de la cavité du protéasome 20S. De par le faible diamètre intérieur du cylindre, une protéine structurale ne peut pas entrer directement sans avoir été « débobinée ». Cette destructuration préalable des protéines constitue donc un mécanisme capable de contrôler l'activité du protéasome.

Le protéasome 19S est le complexe régulateur ATP-dépendant qui va reconnaître et déstructurer les protéines cibles. Il se lie à une extrémité du protéasome 20S (aux 2 extrémités s'il y a 2 complexes régulateurs 19S). Il possède une vingtaine de sous-unités classées en deux groupes, les sous-unités ATPasique et non ATPasique, chacun étant constitué de protéines de 10 à 110 kDa. Le complexe 19S peut être divisé en deux parties : la « base » et le « chapeau ». Ce dernier contient 9 protéines à activité non-ATPasique. Sa principale fonction est d'éliminer les groupements d'ubiquitine présents sur la protéine à dégrader. La base est, quant à elle, composée de 6 sous-unités à activité ATPasique et 4 sous-unités non ATPasiques. Trois fonctions sont associées à la base : la capture des protéines via la

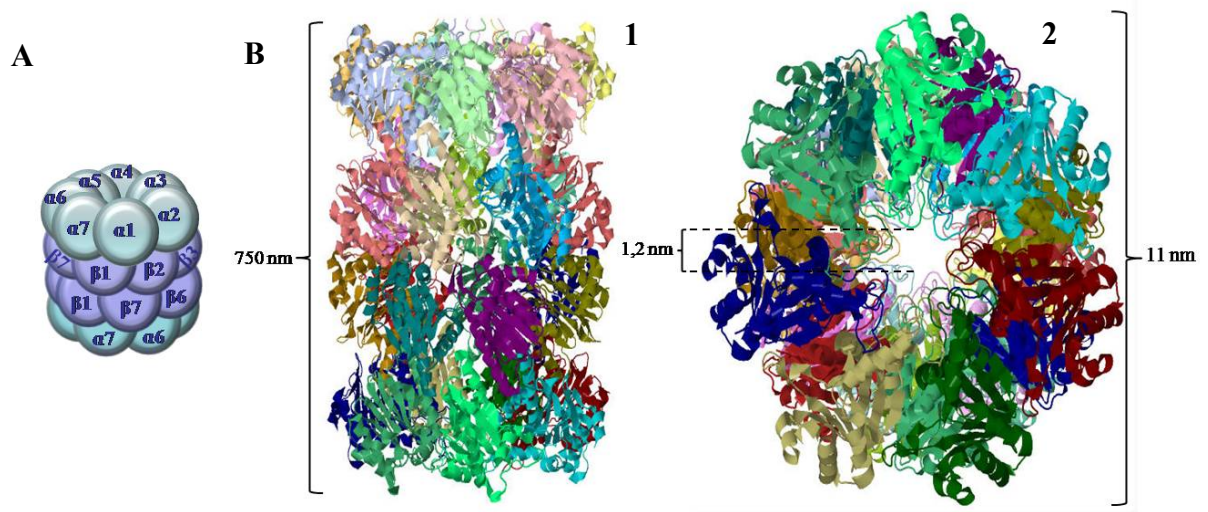


Figure 2 : Structure du protéasome 20S (PDB 3HYE). (A) Représentation schématique du « cœur ». (B) Structure en rubans 3D vue de profil (1) et vue de dessous (2). Le protéasome 20S est un cylindre creux de 750 nm de long, 11 nm de diamètre et 1,2 nm de diamètre intérieur.

reconnaissance de l'ubiquitine, la dénaturation de la protéine et l'ouverture de l'intérieur du cylindre (Goll *et al.*, 2008 ; Tanaka, 2009).

Dans le muscle bovin et la viande d'autruche, le protéasome 20S participe à la dégradation de composants des filaments fins d'actine et les fragments de chaîne légère de myosine des filaments épais. Il participe aussi à la dégradation de la troponine T ou encore la nébuline (Robert *et al.*, 1999 ; Thomas *et al.*, 2004). Ainsi, l'action du protéasome provoque un épaississement des disques Z masquant les bandes I. Au final, ceci aboutit à la dégradation de ces éléments (Dutaud *et al.*, 2006b). Il est à noter que le même phénomène est retrouvé dans les myofibrilles de lapin (Otsuka *et al.*, 1998). En revanche, aucun changement morphologique n'a été observé dans les myofibrilles de mouton (Koohmaraie, 1992b). La dégradation des myofibrilles musculaires se ferait en fait par étapes. L'action du protéasome ne serait pas directe. Les myofibrilles musculaires seraient d'abord soumises à l'action des calpaïnes ou des cathepsines puis ensuite à l'action du protéasome et des enzymes lysosomales (Calkins et Seideman, 1988 ; Robert *et al.*, 1999 ; Taylor *et al.*, 1995b). Sekikawa *et al.* (2001) ont démontré l'implication du protéasome dans la dégradation de protéines couplées à l'ubiquitine. Ces auteurs émettent l'hypothèse que le protéasome 26S fonctionnerait jusqu'à épuisement de l'ATP ; puis le protéasome 20S, libéré après dissociation des complexes régulateurs 19S (Peters *et al.*, 1994), prendrait seul le relais. Dans l'étude protéomique de Houbak *et al.* (2008), l'utilisation d'inhibiteurs des activités « chymotrypsin-like » et « trypsin-like » du protéasome empêche la dégradation de protéines structurales comme la troponine T ou des fragments d'actine du muscle squelettique ou des protéines métaboliques comme la créatine kinase. Le protéasome semble bien impliqué dans la protéolyse *post-mortem*. Il joue donc un rôle dans l'attendrissement du muscle. Dans le muscle bovin, le protéasome est toujours actif après 7 jours *post-mortem*, à un pH inférieur à 6 et proche du pH ultime (Lamare *et al.*, 2002). L'étude de Dutaud *et al.* (2006a) a montré que, dans les conditions physico-chimiques retrouvées dans le muscle *post-mortem*, le protéasome 20S conserve toujours 50% d'activité après 5 semaines de stockage de la viande à 4°C. Cette perte d'activité est similaire, voire moindre, à ce qui a été observé dans cette étude pour les calpaïnes et notamment la calpaïne 1.

V.2.2 Les cathepsines

Les cathepsines (terme issu du grec καθέψω « digérer ») constituent une famille d'enzymes homologues ayant un nombre de fonctions très importantes et qui sont présentes dans tous les types de cellules et tissus à l'exception des hématies (Bond et Butler, 1987). A

ce jour, de nombreuses cathepsines ont pu être identifiées (Tableau IV) et beaucoup d'entre elles sont retrouvées dans le lysosome dans lequel les premières cathepsines ont été identifiées. Le lysosome est un organite cellulaire de 0,2 à 0,5 microns présent dans le cytosol de toutes les cellules eucaryotes animales. Son pH acide, voisin de 4,0, permet aux différentes enzymes présentes d'être actives. La concentration en cathepsines à l'intérieur du lysosome peut dépasser 1 mM. La plupart des cathepsines, présentes dans le lysosome, sont des protéases à cystéine, comme la papaïne, d'où la terminologie anglo-saxonne parfois retrouvée de « papain-like cysteine cathepsins ». Certaines d'entre elles sont cependant des protéases à sérine ou à aspartate (Tableau IV).

Les cathepsines sont synthétisées sous forme de proenzymes inactives (zymogènes), d'une taille variant de 37 à 55 kDa, glycosylées et dirigées vers le lysosome via le récepteur du mannose-6-phosphate. Après clivage du propeptide, elles peuvent rester dans l'organelle ou être libérées dans le cytosol (Chwieralski *et al.*, 2006). Seules les endoprotéases sont capables d'autocatalyse. Les exoprotéases nécessitent l'action d'endoprotéases pour éliminer le propeptide (Dähl *et al.*, 2001). La plupart des cathepsines « papain-like » sont des protéines monomériques dont la masse varie de 22 à 50 kDa et contenant un pont disulfure interne. La seule exception connue est la cathepsine C qui est un tétramère d'environ 200 kDa (Dolenc *et al.*, 1995).

Dans le muscle squelettique, seules 8 cathepsines à activité endopeptidique sont retrouvées, toutes présentes dans le lysosome. Il s'agit des cathepsines B, D, E, F, H, K, L et S (Sentandreu *et al.*, 2002).

Les cathepsines peuvent-elles jouer un rôle dans la protéolyse *post-mortem* du muscle? Il faut pour cela que ces enzymes se retrouvent à l'extérieur de l'organelle et que le pH du milieu soit optimal, proche de 5,5. Après la mort de l'animal, le pH diminue jusqu'au pH ultime voisin de 5,5. Ce pH permet donc aux cathepsines d'agir. Pour leur libération des lysosomes, Zeece *et al.* (1992) ont démontré une dégradation totale des vésicules du muscle *semimandibularis* après 14 jours *post-mortem*. De plus, O'Halloran *et al.* (1997) ont mis en évidence une augmentation de la libération des cathepsines B et L des lysosomes dans le muscle glycolytique *longissimus dorsi* favorisée par le faible pH dans ce tissu. Ceci a été confirmé par Pulford *et al.* (2009) qui ont observé, à faible pH ultime, une augmentation de l'activité de la cathepsine B à partir de 2 jours et jusqu'à 8 jours *post-mortem*. Il semblerait donc que la rupture membranaire du lysosome débute à 2 jours *post-mortem*. Les cathepsines constituent donc un bon candidat pour l'attendrissage de la viande.

Tableau IV : Propriétés des différentes cathepsines des mammifères (adapté des bases de données MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>) et BRENDA (<http://www.brenda-enzymes.org/>). N.D., non déterminé.

Nom	Endoprotéase	Exoprotéase		Type catalytique	Localisation	pH
		Carboxypeptidase	Aminopeptidase			
Cathepsine A	+	+	—	protéase à sérine	lysosome	4 à 7,5 ; optimum à 5,5
Cathepsine B	+	+	+ dipeptidase	protéase à cystéine	lysosome, mélanosome	4 à 6
Cathepsine C	—	—	+ dipeptidase	protéase à cystéine	lysosome	4,5 à 6,8
Cathepsine D	+	—	—	protéase à aspartate	lysosome	4 à 7
Cathepsine E	+	—	—	protéase à aspartate	endosome (+++), lysosome (+)	4 à 7,4
Cathepsine F	+	—	—	protéase à cystéine	lysosome	4,5 à 7,2 ; optimum de 5,2 à 6,8
Cathepsine G	+	—	—	protéase à sérine	membrane cellulaire	optimum à 7,5
Cathepsine H	+	—	+ mono-peptidase	protéase à cystéine	lysosome	4 à 8
Cathepsine K	+	—	—	protéase à cystéine	lysosome (+++), endosome (+)	4 à 8
Cathepsine L	+	—	—	protéase à cystéine	lysosome	4 à 7
Cathepsine M	+	N.D.	N.D.	protéase à cystéine	lysosome	N.D.
Cathepsine N	+	—	—	protéase à cystéine	lysosome	N.D.
Cathepsine O	+	N.D.	N.D.	protéase à cystéine	cytoplasme, cytosquelette	N.D.
Cathepsine P	+	N.D.	N.D.	protéase à cystéine	lysosome (N.D.)	N.D.
Cathepsine R	+	N.D.	N.D.	protéase à sérine	lysosome (N.D.), cytoplasme	4,8 à 7
Cathepsine S	+	—	—	protéase à cystéine	lysosome, extracellulaire	4,5 à 8
Cathepsine T	+	—	—	protéase à cystéine	lysosome	6,5 à 7,5

Tableau IV (*suite*)

Nom	Endoprotéase	Exoprotéase		Type catalytique	Localisation	pH
		Carboxypeptidase	Amino-peptidase			
Cathepsine V	+	—	—	protéase à cystéine	lysosome	4 à 7,2
Cathepsine W	N.D.	N.D.	N.D.	protéase à cystéine	cytoplasme	N.D.
Cathepsine X	—	+ mono-/di-peptidase	—	protéase à cystéine	lysosome	N.D.

Différentes études ont montré, chez le mouton, que les cathepsines sont capables de dégrader certaines protéines constitutives des myofibrilles et des myofilaments. L'incubation pendant 22 heures d'un extrait lysosomal de myofibrilles de muscle *longissimus* ovin avec des myofibrilles du même muscle provoque la dégradation de la myosine (chaînes lourdes et légères), de l' α -actinine, de la desmine et de la troponine-I (Whipple et Koohmaraie, 1991). De plus, après injection d'une solution de chlorure de zinc dans des carcasses de mouton, Koohmaraie (1990) a constaté un arrêt de la protéolyse *post-mortem* et de l'attendrissage. Les ions Zn^{2+} inhibent les protéases à cystéine et bloquent ainsi l'activité des calpaïnes et des cathepsines, notamment B et L.

Chez le lapin, les travaux de Matsuishi et Okitani (2003) indiquent que la cathepsine H dégrade non seulement la chaîne lourde de myosine, ce qui contredit les travaux préalables effectués par Ouali *et al.* (1988), mais aussi l'actine, la tropomyosine et la troponine I. Les cathepsines B et L dégradent aussi la chaîne lourde de myosine, l'actine et la troponine T comme l'ont montré Matsukura *et al.* (1981) et Matsuishi *et al.* (1992).

Chez le porc, les travaux de Gil *et al.* (1998) mettent en évidence l'implication des cathepsines dans l'attendrissage de la viande. En effet, l'activité des cathepsines B et L est très importante, ce qui explique la rapidité d'attendrissage *post-mortem* observée (environ 80% en 5 jours). Cependant, aucune dégradation de la myosine ou de l'actine par les enzymes lysosomales n'a pu être montrée (Koohmaraie *et al.*, 1991a). Une injection d'épinéphrine et des exercices physiques avant l'abattage des animaux provoque une diminution de l'activité des cathepsines B et L dans la fraction myofibrillaire probablement due à une diminution de la libération des cathepsines en raison de l'augmentation du pH ultime (Ertbjerg *et al.*, 1999). A l'inverse, une stimulation électrique des carcasses provoque pratiquement le doublement de l'activité de ces enzymes dans la fraction myofibrillaire du muscle *longissimus dorsi* (Maribo *et al.*, 1999). Enfin, l'étude de Garcia-Garrido *et al.* (2000) a montré que la pâleur des jambons crus espagnols, défaut provoqué par une dégradation accrue des protéines myofibrillaires *post-mortem*, était due à une plus forte activité des cathepsines B et L.

Chez le bovin, les résultats obtenus sont contradictoires. Calkins *et al.* (1987) ont déterminé que l'activité totale des cathepsines B et L ainsi que celle de la β -glucuronidase (une autre enzyme lysosomale) mesurées dans l'heure suivant l'exsanguination interviendraient à hauteur de 37% à 59% dans la variation de tendreté observée à 7 jours *post-mortem*. Les variations des activités des cathepsines B et H expliqueraient, quant à elles, jusqu'à 35% des changements mesurés de force de cisaillement entre 1 et 14 jours *post-mortem* (Calkins et Seideman, 1988). Les travaux de Johnson *et al.* (1990) indiquent que les

activités des cathepsines B et L sont supérieures chez des animaux de race Angus par rapport à des animaux de race Brahman. De plus, l'augmentation de l'activité totale de ces deux enzymes a été associée positivement avec une augmentation de la tendreté. Ces deux enzymes auraient donc une influence sur les changements intervenant durant la maturation. Wheeler *et al.* (1990) et Shackelford *et al.* (1991a) n'ont, en revanche, observé aucune différence d'activité des cathepsines B et L chez des animaux de race Hereford ou Brahman. Ils ont cependant noté une augmentation (non expliquée) de leurs activités à 14 jours *post-mortem*. O'Halloran *et al.* (1997) ont établi qu'une augmentation de l'activité des cathepsines B et L libres était associée avec une augmentation de la tendreté dans le muscle *longissimus dorsi*. Enfin, Whipple *et al.* (1990) n'ont pu établir de relation entre l'activité de la cathepsine B à 1 ou 14 jours *post-mortem* et la mesure de la force de cisaillement ou entre cette activité et l'évaluation de la tendreté par un jury de dégustation. La différence entre ces deux études peut être due au fait que, dans l'étude de Whipple *et al.* (1990), la mesure a été réalisée à 1 ou 14 jours *post-mortem* alors que les observations de O'Halloran *et al.* (1997) ont été réalisées avant et après ces dates. De plus, dans l'étude de Koohmaraie *et al.* (1991a), aucune dégradation des protéines myofibrillaires du muscle *longissimus* par les cathepsines B et L n'a pu être observée. Les travaux d'Uytterhaegen *et al.* (1994) ont remis en cause l'action des protéases à cystéine lysosomales. En effet, dans cette étude, l'utilisation de l'inhibiteur E-64, spécifique des protéases à cystéine (protéases lysosomales et calpaïnes), provoque un arrêt complet du processus d'attendrissage. En revanche, l'injection de Z-Phe-Phe-CHN₂, inhibiteur des cathepsines B et L, et de Z-Phe-Ala-CHN₂, inhibiteur spécifique de la cathepsine L, ne modifie pas les valeurs de force de cisaillement par rapport à un échantillon non traité. Ils ont ainsi pu conclure que les cathepsines lysosomales n'interviennent pas (ou peu) dans le phénomène de maturation. De même, l'injection de pepstatine, un puissant inhibiteur de la cathepsine D, ne modifie pas la dégradation des protéines myofibrillaires et les valeurs de force de cisaillement. Cette enzyme est une protéase à aspartate lysosomale, qui est capable de dégrader l'hémoglobine, la myosine et l'actine chez le rat et le lapin (Schwartz et Bird, 1977) mais également, dans une moindre mesure, le collagène (Scott et Pearson, 1978). Enfin, Caballero *et al.* (2007) ont évalué le rôle des cathepsines lysosomales dans la maturation de la viande chez des animaux issus de deux races locales du nord de l'Espagne. Trois groupes d'animaux ont ainsi été utilisés : un groupe « sauvage », un groupe homozygote pour le gène muté de la myostatine et un dernier groupe hétérozygote pour ce gène. Il ressort de cette étude que l'activité des cathepsines se révèle être plus rapide chez les animaux homozygotes mutés que chez les animaux sauvages. Par ailleurs, les cathepsines interviennent

tout le long du phénomène de maturation. Ainsi, les cathepsines B et L agiraient avant la cathepsine D, qui elle n'interviendrait qu'à partir du 14^{ème} jour.

Enfin, chez le poisson, différents auteurs ont mis en évidence que la dégradation des structures myofibrillaires et du tissu conjonctif serait principalement due à l'action des cathepsines lysosomales. L'étude de Chéret *et al.* (2007) a montré que la cause principale de dégradation protéique *post-mortem* dans le muscle blanc du bar était due aux cathepsines B et L, le système des calpaïnes n'intervenant que secondairement. Chez le flétan, les cathepsines B et L mais aussi la cathepsine D participent ensemble à la dégradation des chaînes lourdes de myosine, de l'actine et de la tropomyosine. De plus, les cathepsines agiraient avant les calpaïnes (Ladrat *et al.*, 2003 ; Delbarre-Ladrat *et al.*, 2004). L'étude de Godiksen *et al.* (2009) a confirmé l'implication de ces trois enzymes dans la texture des muscles de truites arc-en-ciel. Les deux cathepsines B et L provoquent une diminution de la quantité de protéines dans les fibres musculaires conduisant ainsi à une augmentation de la quantité d'eau intracellulaire (Hagen *et al.*, 2008).

V.2.3 Les métalloprotéinases

Les métalloprotéinases (aussi appelées matrixines ou MMPs) constituent un groupe d'enzymes impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire notamment dans la dégradation du collagène. Ceci a suscité l'intérêt des chercheurs. En effet, la dégradation du collagène est importante dans différents mécanismes comme la régénération tissulaire ou certaines maladies telles que l'arthrite, certains cancers ou l'athérosclérose. Ces protéines sont retrouvées dans différents organismes du règne animal (la drosophile, le nématode, l'hydre, l'oursin) et végétal (*Arabidopsis thaliana*). Chez l'Homme, 23 gènes codant ces protéines ont été identifiés.

Les matrixines sont des endoprotéases à multiples domaines de liaison aux ions Zn^{2+} , indispensables à la réaction catalytique. Elles nécessitent également d'autres ions comme les ions Ca^{2+} (figure 3A). Ces protéinases sont caractérisées par un cœur catalytique, le site de liaison au zinc, d'environ 170 résidus, constitué d'un motif conservé HEXXHXXGXXH (figure 3B). Les matrixines sont synthétisées sous forme de pré-proenzymes (proMMP) avec un peptide signal. Le propeptide, d'environ 80 acides aminés, contient le motif PRCGXPD dans lequel le résidu cystéine interagit avec le domaine actif, rendant ainsi le proMMP inactif ou latent (Van Wart et Birkedal-Hansen, 1990). Dans la plupart de ces enzymes, il existe un peptide de liaison de longueur variable, aussi appelée région charnière, ainsi qu'un domaine

A



B

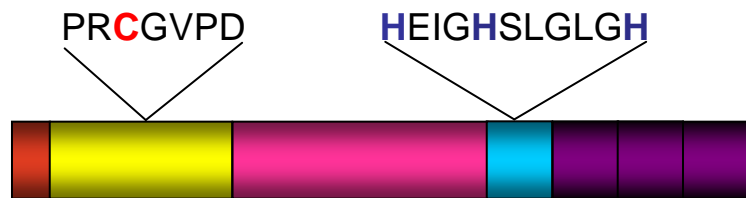


Figure 3 : La métalloprotéinase MMP-12 du macrophage humain (PDB 3BA0). (A) Représentation en rubans 3D. Les ions zinc du site catalytique sont représentés par des sphères rouges et les ions calcium par des sphères bleues. (B) Représentation schématique des différents domaines de MMP-12. Le peptide signal et le propeptide sont représentés en rouge et en jaune, respectivement. Le domaine catalytique, le domaine de liaison au zinc et le domaine hémopexine sont en rose, bleu et en violet, respectivement. Dans le propeptide, on retrouve la cystéine (en rouge) du motif PRCGVPD rendant la proenzyme inactive. Dans le domaine de liaison au zinc, les trois résidus histidine conservés (en bleu) assurent la liaison à l'ion.

hémopexine d'environ 200 résidus contribuant à la spécificité vis-à-vis du substrat et des inhibiteurs endogènes (Cauwe *et al.*, 2007).

Cette famille de protéases est divisée en trois sous-groupes comprenant les collagénases, les gélatinases et les « Membrane-Type » metalloprotéinases (MT-MMPs) (Birkedal-Hansen *et al.*, 2003). Les collagénases sont au nombre de 3 : la collagénase 1 (MMP-1), la collagénase 2 (MMP-8 ou « neutrophile collagenase ») et la collagénase 3 (MMP-13). Elles sont responsables principalement du clivage des fibres de collagène de type I, II et III et, accessoirement les collagènes de type VII et X. Les gélatinases sont au nombre de 2 et sont appelées gélatinases A (MMP-2) et B (MMP-9). Elles dégradent les molécules de collagène dénaturées, la gélatine ainsi que des constituants de la matrice extracellulaire comme les collagènes natifs de type IV, V ou XI, la laminine, l'élastine, le protéoglycane et la fibronectine. Par ailleurs, MMP-2 est également capable de digérer les collagènes natifs de type I, II et III (Murphy et Nagase, 2008). Une relation semble exister entre le collagène, plus exactement dans la notion de collagène soluble et insoluble, et la tendreté de la viande. Cependant, aucune recherche n'a été menée sur la relation entre les metalloprotéinases, en particulier les collagénases, et le collagène durant la maturation *post-mortem* ainsi que sur la tendreté de la viande. Une telle étude serait cependant intéressante sachant que dans le muscle squelettique, la matrice extracellulaire est constituée de protéoglycannes, de glycoprotéines et de fibres de collagène de type I, III à VI, XII et XIV (Listrat *et al.*, 1999). Ces fibres étant des cibles potentielles des collagénases 1 à 3 et des gélatinases A et B, il serait intéressant d'observer l'effet de ces protéinases sur le tissu conjonctif en général, ainsi que sur les « liaisons » entre ce tissu et les fibres musculaires, MMP-2 et -9 étant capables de détruire les liaisons entre la membrane cellulaire et la matrice (Matsumura *et al.*, 2005).

V.2.4 Les calpaïnes

Parmi les protéases à cystéine, les calpaïnes représentent certainement l'un des groupes les plus importants avec de très nombreuses peptidases structurellement très proches. Ce sont des protéases à cystéine calcium-dépendantes d'où leur nom initial de « Calcium-Activated Proteases Neutral » ou CAPN (figure 4A). A ce jour, 14 membres ont été identifiés. Elles sont, selon le cas, ubiquistes ou tissu-spécifiques (tableau V). Les deux calpaïnes ubiquistes les plus étudiées sont sans conteste la calpaïne 1 (ou μ -calpaïne) et la calpaïne 2 (ou m-calpaïne). Ces deux protéases sont actives à des concentrations de calcium de l'ordre du micro- et du milli-molaire, respectivement. Les calpaïnes sont des hétérodimères

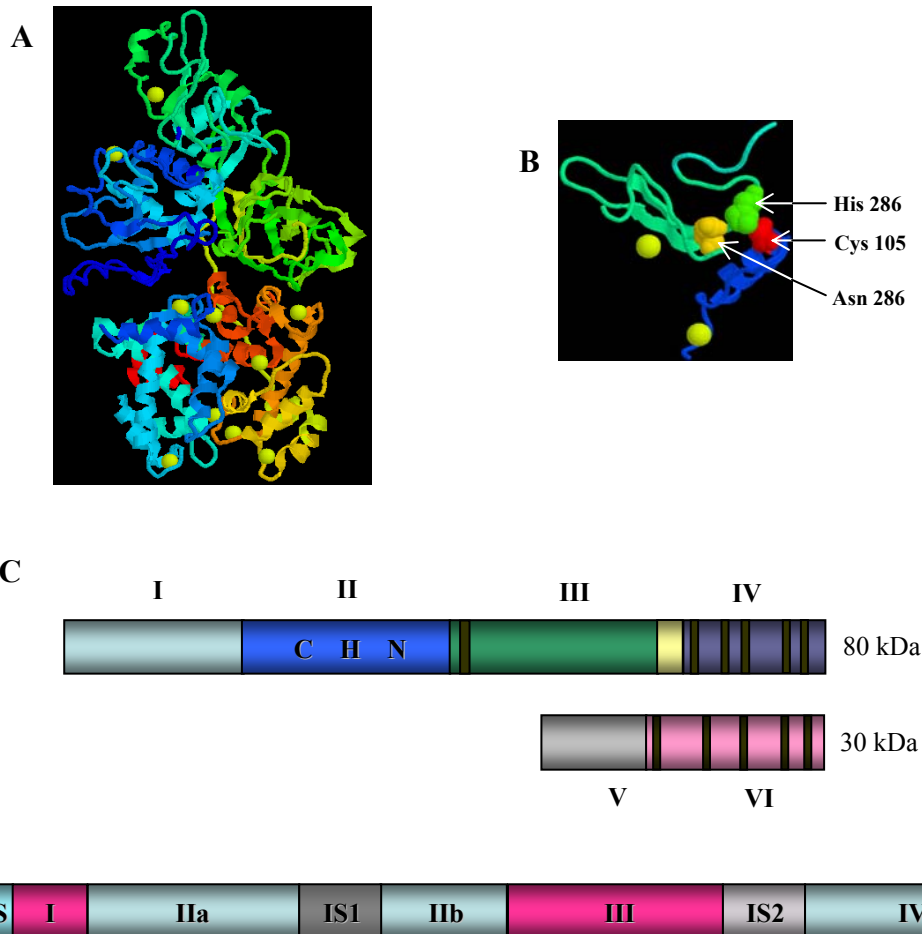


Figure 4 : Les calpaïnes. **(A)** Structure tridimensionnelle de la m-calpaïne (PDB 3DF0) avec les ions calcium (10, en jaune) nécessaires pour activer la calpaïne en jaune. **(B)** Grossissement de la zone catalytique avec les résidus histidine, cystéine et asparagine en vert, rouge et orange, respectivement. **(C)** Représentation schématique des différents domaines retrouvés dans la calpaïne 2. Les séquences « EF-hand » des domaines IV et VI des sous-unités 80 kDa et 30 kDa sont symbolisées par les boîtes noires. Quatre de ces domaines fixent le calcium, le dernier assure une liaison entre les deux sous-unités. Les lettres C, H et N représentent les trois acides aminés impliqués dans la triade catalytique et la boîte jaune correspond au « linker ». **(D)** Structure de la calpaïne-3. Le domaine NS est inséré en amont du domaine I alors que les domaines IS1 et IS2 sont des séquences insérées entre les domaines IIa et IIb, III et IV, respectivement. Les domaines I, IIa, IIb, III et IV ont les mêmes propriétés que pour les calpaïnes 1 et 2 (d'après Goll et al., 2003).

constitués de deux sous-unités, une sous-unité catalytique de 80 kDa et une sous-unité régulatrice d'environ 30 kDa. La grosse sous-unité possède l'activité protéasique et est spécifique de la calpaïne considérée. La sous-unité régulatrice est, quant à elle, commune à l'ensemble des calpaïnes (figure 4C). La sous-unité catalytique est constituée de 4 domaines (numérotés de I à IV) : le domaine I, situé du côté N-terminal, contient le site de clivage autolytique. Le domaine II, catalytique, contient les trois résidus impliqués dans la réaction enzymatique, une cystéine, une histidine et une asparagine (figure 4B). En absence de calcium, le résidu cystéine est trop éloigné des deux autres résidus pour interagir. En revanche, une fois l'ion Ca^{2+} fixé, il s'opère un changement conformationnel qui va permettre la formation de la triade catalytique. Le domaine III assure la liaison entre le domaine de fixation du calcium (domaine IV) et le domaine catalytique (II). Entre ces deux domaines se trouve une séquence appelée « linker ». La forte homologie de séquence avec les protéines de liaison du calcium appartenant à la famille « EF-hand » a conduit à donner à ce domaine le nom anglais de « calmodulin-like calcium domain ». La sous-unité régulatrice est constituée des domaines V et VI. Le domaine V, localisé à l'extrémité N-terminale, est hydrophobe et contient de nombreux résidus glycine. Cette sous-unité régulatrice possède également un domaine de liaison de plusieurs proline qui connecte ce domaine au domaine VI. Ce dernier est très similaire au domaine IV de la sous-unité catalytique. A l'instar du domaine IV, il possède 5 domaines « EF-hand » capables de fixer le calcium. Les 4 premiers fixeraient les ions Ca^{2+} tandis que le dernier servirait de site de liaison entre les deux sous-unités (Carafoli et Molinari, 1998 ; Goll *et al.*, 2003). Les calpaïnes 1, 2 et 3 (la calpaïne 3 étant aussi connue sous le nom de p94) sont présentes dans le muscle squelettique. p94 est une isoforme spécifique du muscle squelettique retrouvée au niveau du disque Z, des bandes M, I et au niveau des jonctions myotendineuses (Taylor *et al.*, 1995a ; Taveau *et al.*, 2003). En plus des 4 domaines de la sous-unité catalytique, elle est constituée de 3 séquences insérées, NS, IS1 et IS2, situées respectivement à l'extrémité N-terminale, dans le domaine II et à la fin du domaine III (figure 4D). La séquence NS est riche en proline et correspond au propeptide régulateur retrouvé dans certaines protéases à cystéine. IS1 contient 3 domaines autolytiques et IS2 est important dans le contrôle de l'activité de la calpaïne 3 (Duguez *et al.*, 2006). En se basant sur la composition de leur domaine et leur distribution tissulaire, les membres de la superfamille des calpaïnes sont classés en 3 groupes : ubiquitaires (calpaïnes 1 et 2), tissu-spécifiques (calpaïne 3, nCl-2 et nCl-4) et atypiques ou non-conventionnels pour les autres calpaïnes (Croall et Ersfeld, 2007).

Tableau V : Les calpaïnes identifiées chez les mammifères

Protéine	Autres noms	Gène	Distribution
Calpaïne 1	CAPN1, μ -calpaïne	<i>capn1</i>	Ubiquitaire
Calpaïne 2	CAPN2, m-Calpaïne	<i>capn2</i>	Ubiquitaire
Calpaïne 3	nCL-1, p94, Lp82, Lp85, Rt88	<i>capn3</i>	Muscle squelettique, rétine
Calpaïne 5	Htra3, nCL-3	<i>capn5</i>	-
Calpaïne 6	CAPNX, calpamoduline	<i>capn6</i>	Placenta
Calpaïne 7	palBH	<i>capn7</i>	Ubiquitaire
Calpaïne 8	nCL-2	<i>capn8</i>	Muqueuse stomacale
Calpaïne 9	nCL-4	<i>capn9</i>	Voies digestives
Calpaïne 10	CAPN10, CAPN8	<i>capn10</i>	Ubiquitaire
Calpaïne 11		<i>capn11</i>	Testicules
Calpaïne 12		<i>capn12</i>	Ubiquitaire
Calpaïne 13		<i>capn13</i>	Ubiquitaire
Calpaïne 14		<i>capn14</i>	Testicules et poumons
Calpaïne 15	Sol H	<i>capn15</i>	Ubiquitaire
Petite sous-unité 1	CAPN4	<i>capn-s1</i> ou <i>cpns1</i>	Ubiquitaire
Petite sous-unité 2		<i>capn-s2</i> ou <i>cpns2</i>	-

Il existe un grand nombre d'arguments permettant de lier les calpaïnes au processus de maturation *post-mortem* du muscle en viande. Les calpaïnes sont des protéases à cystéine calcium-dépendantes. Avant de déterminer le rôle des calpaïnes dans la maturation, il a fallu démontrer le rôle des ions calcium dans l'attendrissage. Ainsi, l'étude de Davey et Gilbert (1969) a montré que la présence d'EDTA empêche la fragilisation et la disparition du disque Z. Par la suite, Busch *et al.* (1972) démontrèrent que la fragmentation des myofibrilles était stoppée par l'action de l'EDTA mais induite par les ions calciques. Des résultats similaires, en présence d'EGTA (un chélateur d'ions à forte affinité pour les ions calcium), furent obtenus par l'équipe de Koohmaraie *et al.* (1989). Puis, Koohmaraie (1990) montra que l'incubation de carcasses ovines dans du chlorure de zinc provoque l'arrêt de l'attendrissage, les ions Zn^{2+} inhibant l'activité des calpaïnes et des cathepsines. Le rôle majeur des calpaïnes a été établi par l'étude d'Uytterhaegen *et al.* (1994) ; l'administration *in situ* d'inhibiteurs exogènes des calpaïnes dans des morceaux de muscles *longissimus thoracis* empêche la protéolyse *post-mortem*. Zamora *et al.* (1996) suggérèrent que la vitesse de diminution d'activité de la calpaïne 1 reflétait le mieux l'état de protéolyse lors de la maturation. Enfin, Huff-Lonergan *et al.* (1996), en incubant la μ -calpaïne avec un extrait protéique de myofibrilles de *longissimus thoracis*, ont obtenu le même profil de dégradation de la desmine que lors de la protéolyse *post-mortem*. Dans le muscle bovin et ovin, l'activité *post-mortem* de la calpaïne 1 diminue alors que celle de la calpaïne 2 reste stable (Kretchmar *et al.*, 1990; Zamora *et al.*, 1998; Geesink et Koohmaraie, 1999a; Veiseth *et al.*, 2001; Ilian *et al.*, 2001); la contracture au froid (« cold shortening ») ne modifie pas les quantités de calpaïnes, les faibles températures diminueraient seulement leur activité expliquant la dureté de la viande dans ces conditions (Zamora *et al.*, 1998). De plus, chez le bovin, la concentration calcique est d'environ 200 μM à 3 jours *post-mortem* (Ji et Takahashi, 2006) ce qui ne permet pas d'activer la calpaïne 2. La preuve la plus flagrante de l'action de la calpaïne 1 a été apportée par l'analyse des muscles d'une souris knockout pour le gène *capn1*. L'étude a clairement démontré que, chez cette souris, la protéolyse *post-mortem* était très fortement inhibée (Geesink *et al.*, 2006). Cela a également permis d'identifier la desmine, la nébuline, la dystrophine, la méta-vinculine et la troponine T comme étant des cibles des calpaïnes. En 1992, Dransfield proposa un modèle théorique dans lequel les paramètres régissant l'activité de la calpaïne 1 permettraient de prédire jusqu'à 68% des variations de dureté de la viande. Enfin en 2004, Salem *et al.* montrèrent que l'attendrissage de muscle de truite pouvait être accéléré par l'activation des calpaïnes par l'apport de calcium exogène.

La calpaïne 3 semble également impliquée dans la maturation de la viande car elle est liée à la titine (ou connectine) au niveau de la ligne N₂, une zone sensible à la protéolyse lors de l'attendrissage. Une corrélation positive existe également entre le taux d'autolyse de cette calpaïne et la protéolyse *post-mortem* dans les muscles ovins *longissimus thoracis* et *lumborum* (Ilian *et al.* 2004a; b). De plus, la calpaïne 3 n'étant pas inhibée par la calpastatine (Sorimachi *et al.*, 1993), son activité peut être maintenue durant tout le processus de dégradation de protéines myofibrillaires. Cependant, Parr *et al.* (1999) n'ont pas constaté de différence de taux d'autolyse ou de quantité de calpaïne 3 dans des muscles *longissimus* de cochons phénotypés tendres ou durs. Enfin, l'étude structurale comparative et protéolytique de muscles *post-mortem* de souris knockout pour le gène codant la calpaïne 3 et de souris sauvages a permis de montrer que l'autolyse constatée de la calpaïne 3 est indépendante de la dégradation protéique. Cette protéine joue donc un rôle mineur dans la protéolyse *post-mortem* du muscle (Geesink *et al.*, 2005).

Si pour certains auteurs, les calpaïnes sont les seules protéases impliquées dans la maturation *post-mortem* du muscle en viande, différentes études remettent en question ce postulat. Ainsi, l'étude récente de Camou *et al.* (2007) a montré que la calpaïne 1, obtenue à partir de 4 muscles bovins, perd près de 90% de son activité au bout de 24 heures *post-mortem* et, après 48 heures, la calpaïne est totalement inactive. De plus, l'activité des calpaïnes 1 et 2 est dépendante du pH ultime et de la température. En effet, à un pHu de 5,8 et à 4°C, plus aucune activité des deux calpaïnes n'est constatée au bout de 24 heures. L'ensemble de ces résultats suggère donc que les calpaïnes ne sont pas les seules à agir et que le processus de maturation implique d'autres enzymes.

V.2.5 Les protéases à sérine

Parmi les enzymes protéolytiques, les protéases à sérine représentent plus du tiers des 26000 protéases référencées dans la base de données MEROPS. Initialement, les peptidases à sérine ont été répertoriées en 22 familles regroupées en 6 clans (Rawlings et Barrett, 1993 ; Barrett et Rawlings, 1995). Aujourd'hui, en se basant sur leur structure tridimensionnelle, elles sont divisées en 13 clans et près de 40 familles (tableau VI). Les protéases à sérine sont retrouvées dans tous les organismes ainsi que dans les bactéries et les virus. Les clans SB et SC sont majoritaires chez les archées, les procaryotes, les champignons et les plantes. Le clan PA, retrouvé exclusivement chez les eucaryotes, est le plus étudié. Il comporte le plus grand nombre de membres dont la trypsine, la chymotrypsine ou l'élastase. Dans la suite de ma présentation, je m'appuierai sur les données existantes relatives à ce clan.

V.2.5.1 Structure et mécanisme catalytique des protéases à sérine

Leur nom est dû à la présence du résidu nucléophile sérine situé dans le site actif et responsable de la catalyse. Outre ce résidu omniprésent, un ou deux autres résidus supplémentaires interviennent dans le site actif, constituant ainsi la dyade ou la triade catalytique (tableau VI). L'activation de la plupart des protéases à sérine de type tryptique nécessite au préalable le clivage du précurseur enzymatique, ou zymogène, inactif. Le clivage se produit au même endroit pour tous les membres du clan PA, entre les résidus 15 et 16. Après clivage des 15 premiers résidus amino-terminaux, un pont salin se forme entre le premier résidu (Ile 16) et l'aspartate 194 dans le cas de la chymotrypsine, ce qui induit un changement de conformation de l'enzyme (figure 5). Ceci permet alors la structuration, d'une part, de la triade catalytique et, d'autre part, de la poche qui permet de stabiliser la triade durant la réaction enzymatique (figure 6). Dans ce clan, les trois résidus formant la triade catalytique sont la sérine 195, l'histidine 57 et l'aspartate 102. Un réseau de liaisons hydrogène entre ces acides aminés va permettre d'orienter et de stabiliser l'ensemble de la triade. Ainsi, des liaisons vont s'opérer entre les atomes d'oxygène de l'aspartate 102 et l'atome d'hydrogène porté par un atome d'azote du noyau imidazole de l'histidine 57. Le second atome d'azote du noyau imidazole forme une liaison hydrogène avec l'atome d'hydrogène de la fonction hydroxyle de la sérine 195. La poche, qui stabilise la triade catalytique, est formée par les atomes d'azote de la glycine 193 et de la chaîne principale de la sérine 195. Ces atomes forment une poche chargée positivement qui va stabiliser la charge

Tableau VI : Les clans, familles et résidus catalytiques des protéases à sérine

Clan	Nombre de Familles	Exemple	Résidus catalytiques
PA	12	Trypsine	His, Asp, Ser
SB	2	Subtilisin	Asp, His, Ser
SC	6	Prolyl oligopeptidase	Ser, Asp, His
SE	3	D-Ala-D-Ala carboxypeptidase	Ser, Lys
SF	2	Répresseur LexA	Ser, Lys/His
SH	1	Assembleine du Cytomegalovirus	His, Ser, His
SJ	3	Lon	Ser, Lys
SK	3	Clp	Ser, His, Asp
SP	1	Nucléoporine	His, Ser
SQ	1	Amino-peptidase DmpA	Ser
SR	1	Lactoferrine	Lys, Ser
SS	1	L,D-carboxypeptidase	Ser, Glu, His
ST	1	Rhomboïde	His, Ser

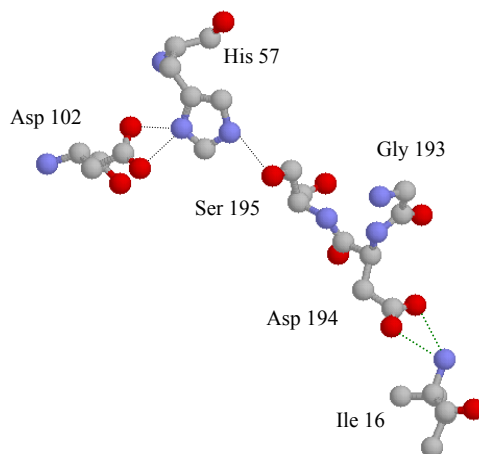


Figure 5 : Les acides aminés de la triade catalytique de la chymotrypsine bovine (PDB 1YPH). Les trois résidus Ser195, Asp102 et His 57 constituent la triade catalytique. Elle est stabilisée par des liaisons hydrogène (pointillés noirs) et un pont salin (pointillés verts) formé par l'isoleucine 16 et l'aspartate 194. Les atomes d'oxygène, d'azote et de carbone sont représentés par des sphères rouges, bleues et grises, respectivement.

négative de l'intermédiaire tétraédrique formé lors de la réaction enzymatique. La catalyse de la liaison peptidique passe par deux intermédiaires tétraédriques. Au départ, l'atome d'oxygène de la fonction hydroxyle de la sérine 195 attaque le substrat, avec l'aide de l'histidine 57. Ce premier intermédiaire tétraédrique est stabilisé par les atomes de la poche. Il génère l'acylenzyme stabilisé par l'histidine 57. Une molécule d'eau vient déplacer le fragment polypeptidique libre, attaque l'acylenzyme et produit le second intermédiaire tétraédrique. Celui-ci est stabilisé par la poche. Il en résulte la libération de la seconde partie du substrat avec régénération des résidus sérine 195 et histidine 57.

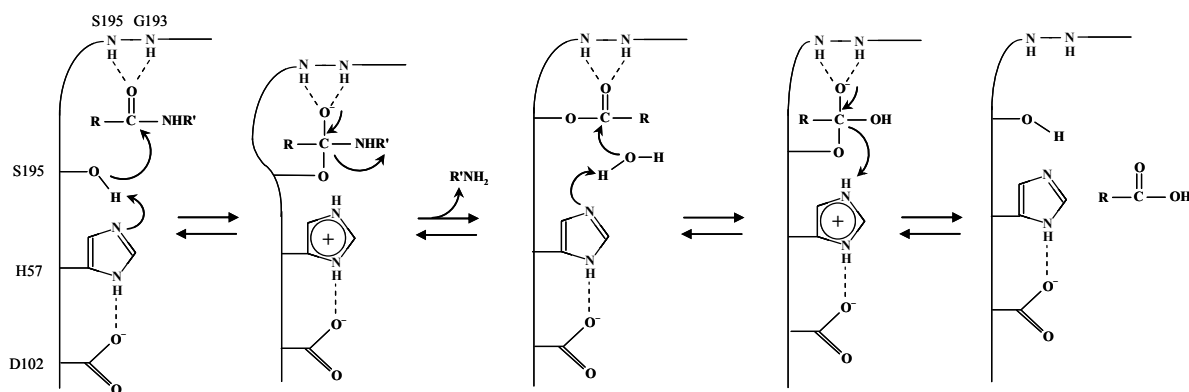


Figure 6 : Représentation schématique du mécanisme d'action des protéases à sérine. Dans cette représentation, seules les chaînes latérales de la poche catalytique sont indiquées. La réaction enzymatique avec la cible ($RCONHR'$) nécessite la contribution d'un atome d'oxygène de la sérine 195 ainsi que l'hydrogène de sa chaîne principale. Le clivage de la cible passe par la formation de deux intermédiaires réactionnels tétraédriques et conduit à la libération des molécules $R'NH_2$ et $RCOOH$ (adapté de Hedstrom, 2002).

V.2.5.2 Protéases à sérine et maturation *post-mortem* du muscle

Peu d'études ont été menées sur l'implication possible des protéases à sérine dans l'attendrissage de la viande. En effet, il a été constaté que l'activité des protéases à sérine résultait d'une contamination par des cellules non musculaires comme les mastocytes, cellules que l'on retrouve principalement dans le tissu conjonctif (Woodbury *et al.*, 1978 ; Libby et Goldberg, 1980). Les protéases à sérine ne semblaient pas présentes au sein des cellules musculaires, mais plutôt dans la matrice extracellulaire (Birkedal-Hansen *et al.*, 2003). Il a fallu attendre, l'étude par immunolocalisation de Stauber *et al.* (1983), pour établir la présence de ces protéases dans des cellules musculaires. Depuis, différentes protéases à sérine ont été purifiées dans les muscles de différents organismes, comme la souris, le porc, l'autruche ou certains poissons. Chez la souris, il a été montré une dégradation des constituants myofibrillaires par la protéase M extraite (Ishiura *et al.*, 1985 ; Sangorrín *et al.*,

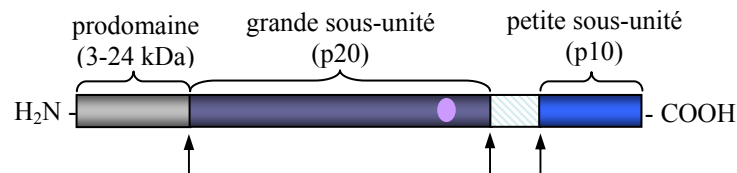


Figure 7 : Représentation schématique d'une procaspase de mammifère. Elle est constituée d'un prodomaine (DD) en position N-terminale, une grande sous-unité (p20) et une petite sous-unité (p10). L'activation de la procaspase nécessite son clivage. Les sites de clivage sont indiqués par les flèches et la séquence conservée QACXG porteuse de la cystéine catalytique est représentée par le symbole ● (adapté de Chowdury et al., 2008).

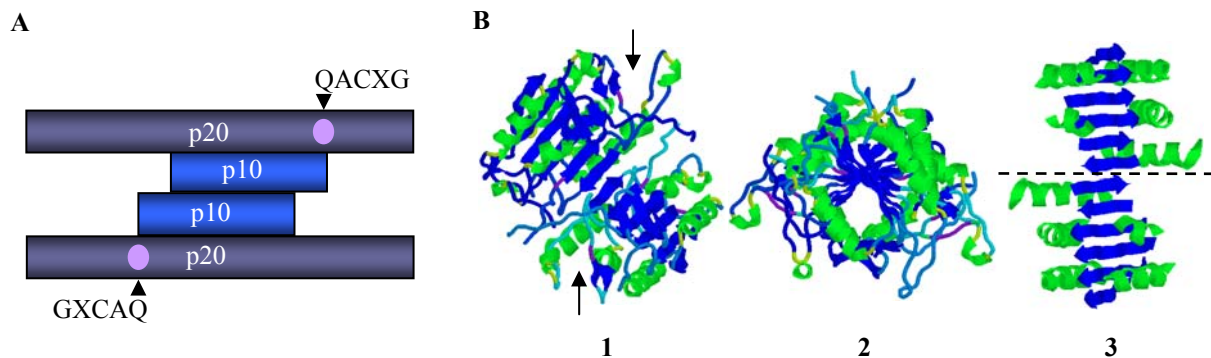


Figure 8 : Représentation schématique (A) et tridimensionnelle (B) de la caspase 3 (PDB 3EDQ). La caspase est un homodimère d'hétérodimères constitué de deux grandes sous-unités p20 et deux petites sous-unités p10. Structuralement, la caspase est un cylindre (B2) avec en son centre, douze feuillets β (6 pour chaque hétérodimère) et 5 hélices α (B3). Chaque caspase contient deux sites actifs situés aux deux extrémités du tétramère (flèches noires en B1) (adapté de Chowdury et al., 2008).

2000, 2002 ; Ohkubo *et al.*, 2004 ; Tshidino *et al.*, 2009). Bien que peu d'études aient été menées sur l'implication des protéases à sérine dans la maturation de la viande, certaines ont permis d'établir, de façon indirecte, un rôle pour ces enzymes dans ce processus. Ainsi, l'utilisation de PMSF (PhenylMethylSulfonyl Fluoride), un inhibiteur des protéases à sérine, sur des morceaux de viande provoque une augmentation de la dureté et montre ainsi l'implication de ces protéases dans le phénomène d'attendrissage (Uytterhaegen *et al.*, 1994 ; Alarcon-Rojo et Dransfield, 1995).

V.2.6 Les caspases

Les caspases (« cysteine-dependant aspartyl-specific protease ») appartiennent à une famille de protéases à cystéine qui clivent leur cible après un résidu aspartate contenu dans un motif tétrapeptidique spécifique pour chaque caspase considérée. Elles sont essentielles dans l'initiation et l'exécution de l'apoptose ainsi que dans la maturation des cytokines inflammatoires. Les caspases sont synthétisées sous forme de zymogènes inactifs appelés procaspases constituées d'une seule chaîne polypeptidique de 30 à 55 kDa organisée en trois régions (figure 7). Un prodomaine appelé domaine de mort (DD pour « Death Domain ») de taille variant de 3 à 24 kDa est situé à l'extrémité N-terminale. Ce domaine est responsable de la transduction du signal apoptotique. Chaque domaine DD contient deux sous-domaines, le domaine effecteur de mort (DED pour « Death Effector Domain ») et le domaine de recrutement de caspase (CARD pour « CAspase-Recruitment Domain »). Structuralement, ces deux sous-domaines sont chacun formés par 6 ou 7 hélices α qui permettent l'interaction avec d'autres protéines ayant ces mêmes domaines par des liaisons électrostatiques ou hydrophobes. Une petite région catalytique (p10), de 10 à 13 kDa, est localisée en position C-terminale. Le centre de la proenzyme correspond à la grande sous-unité catalytique (p20). Elle contient la cystéine catalytique appartenant au motif conservé 'QACXG' (figure 8A). Chaque procaspase devient active après trois coupures en position C-terminale des résidus aspartate spécifiques. Ainsi, les caspases peuvent potentiellement s'autoactiver. Les sous-unités générées forment un hétérotétramère actif. De manière plus détaillée, une sous-unité p10 va s'associer avec une sous-unité p20 formant un hétérodimère qui va s'associer avec un autre hétérodimère, donnant ainsi un homodimère d'hétérodimères. Les sous-unités de chaque hétérodimère sont liées par des interactions hydrophobes leur conférant une structure cylindrique compacte avec en son centre, un feuillet β composé de 6 brins anti-parallèles.

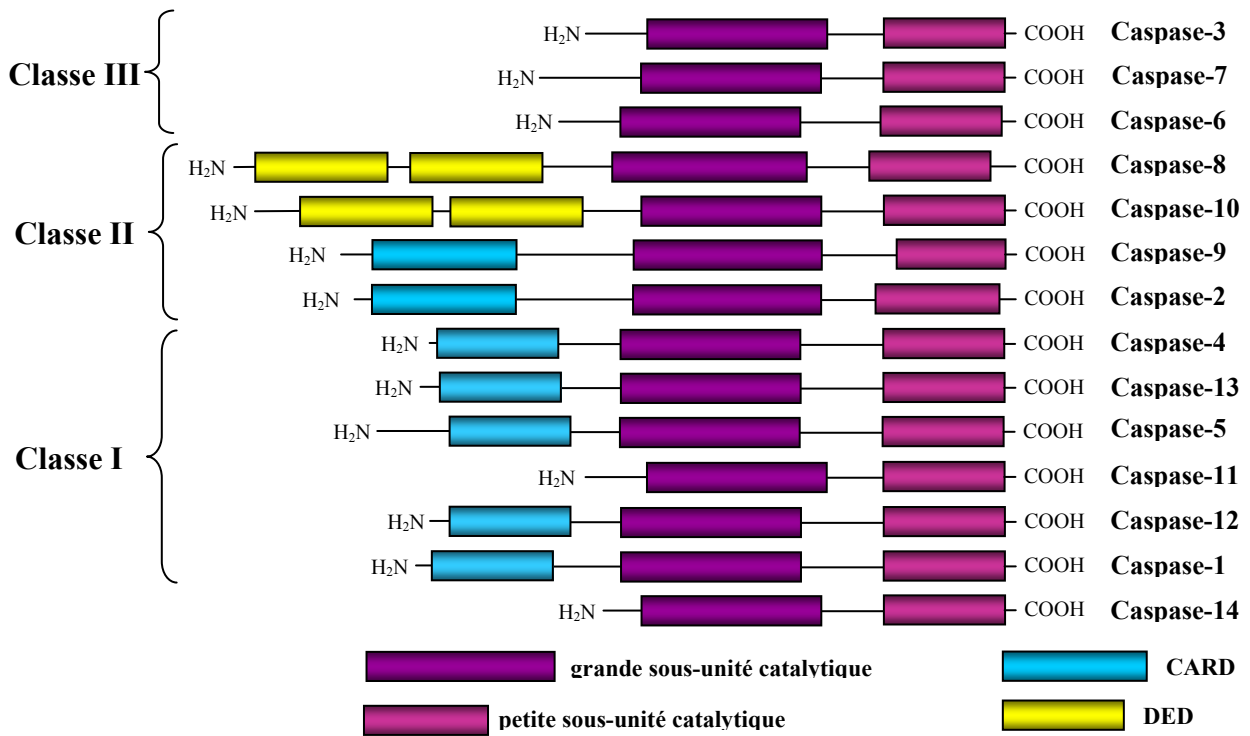


Figure 9 : Les caspases chez les mammifères.

Classe I : caspases inflammatoires

Classe II : caspases initiateuses de l'apoptose

Classe III : caspases effectrices (exécutrices) de l'apoptose

Les différents domaines des caspases (DED, CARD, petite sous-unité (p10) et grande sous-unité (p20) catalytiques) sont représentés par des rectangles de couleur (adapté de Rupinder et al., 2007).

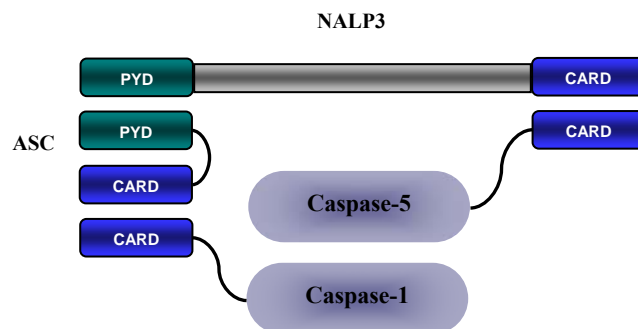


Figure 10 : Schéma de l'inflammasome. Il résulte de l'assemblage du pyroptosome et d'un membre de la famille NLR, ici NALP3. Le pyroptosome est constitué de la caspase 1 reliée à la protéine ASC via leurs domaines CARD (en bleu). L'association de l'ASC et NALP3 se fait par leurs domaines PYD (en vert). Le domaine CARD de la caspase 5 est lié au domaine CARD de NALP3 (Li et Yuan, 2008).

Deux hétérodimères vont ensuite interagir via leurs feuillets β respectifs. Dix hélices α se répartissent en 2 groupes de 5 qui entourent le plan formé par les 12 brins. Par ailleurs, les cylindres sont assemblés dans une conformation tête-bêche, les deux sites actifs (un pour chaque hétérodimère) étant situés aux deux extrémités du tétramère (figure 8B).

Chez l'Homme, onze caspases, comprenant les caspases 1 à 10 et la caspase 14, ont été identifiées (figure 9). D'autres caspases ont également été mises en évidence chez le bovin ou les rongeurs comme les caspases 11, 12 et 13. Les caspases peuvent être divisées en trois classes selon leurs fonctions et la présence d'un long ou d'un court prodomaine : les caspases avec un long prodomaine impliquées dans l'inflammation (classe I), les caspases initiatrices de l'apoptose possédant un long domaine N-terminal (classe II) et les caspases effectrices apoptotiques avec un petit prodomaine (classe III) (Thornberry, 1998 ; Riedl et Shi, 2004 ; Chowdhury *et al.*, 2008 ; Li et Yuan, 2008 ; Sakamaki et Satou, 2009). La caspase 14 n'appartient à aucune de ces 3 classes. En effet, elle présente une évolution, une expression et une fonction différente des autres caspases (Denecker *et al.*, 2008).

V.2.6.1 Les caspases de classe I

Elles sont au nombre de 6, les caspases 1, 4, 5, 11, 12 et 13. Elles font partie de la superfamille des « caspases inflammatoires ». A l'exception de la caspase 11, elles possèdent un prodomaine CARD. La caspase-1, la première identifiée, portait initialement le nom d'ICE pour « Interleukin (IL)-1 β -converting enzyme ». Comme son nom l'indique, cette enzyme clive et active la cytokine IL-1 β , une molécule responsable de la réponse inflammatoire chez les mammifères. L'activation des caspases 1 et 5 passe par la formation obligatoire d'un complexe cytosolique de 700 kDa, le « pyroptosome ». Cette structure est responsable de la réponse inflammatoire et, dans certains cas, d'un processus de mort appelé pyroptosis distinct de la mort cellulaire programmée. Ce processus particulier se produit en réponse à une infection par différents pathogènes viraux ou bactériens. Le « pyroptosome » correspond à l'assemblage des caspases avec la protéine ASC pour « Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD » via leur domaine CARD. Dans certains cas, une protéine, la pyrine, est ajoutée. Elle interagit via son motif PYD avec celui de la protéine ASC. Il existe également un second complexe cytosolique, « l'inflammasome » (figure 10). Il correspond à un « pyroptosome » sur lequel se greffent des membres de la famille NLR pour « Nucleotide-binding and oligomerization domain Leucine-rich Repeat » et qui varient selon les *stimuli*.

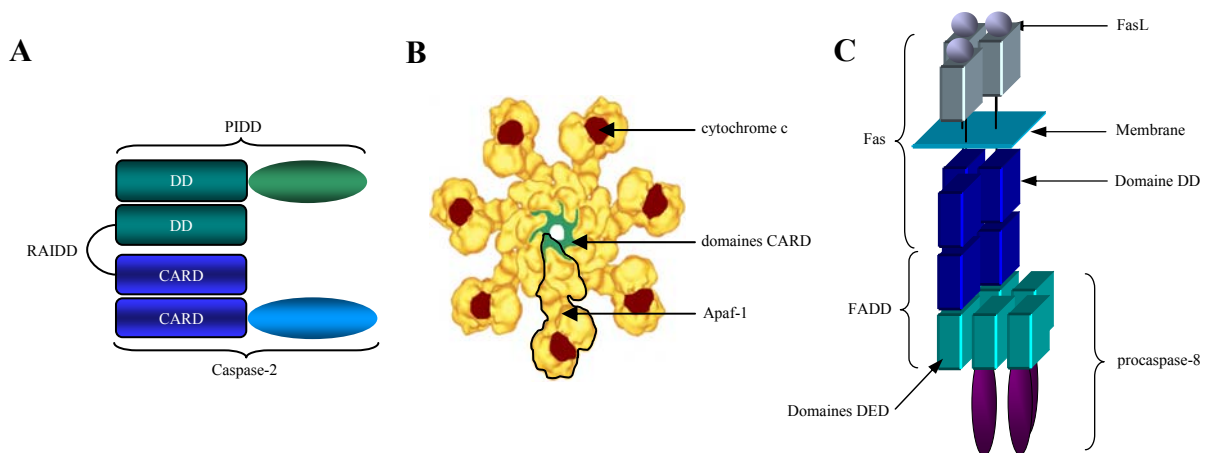


Figure 11 : Les complexes protéiques responsables de l'activation des caspases initiatrices. L'activation de la caspase 2, la caspase 9 et la caspase 8 est réalisée par le PIDDSome (A), l'apoptosome (B) et le complexe DISC (C), respectivement. (A) Le PIDDSome contient 3 éléments, PIDD, RAIDD et la caspase 2. (B) L'apoptosome est composé de 7 molécules Apaf-1 (entourée en noir) liées à 7 molécules de cytochrome c (en bordeaux) en présence d'ATP. En dessous de l'apoptosome se trouve un anneau central formé par les domaines CARD (en vert), qui servira à la liaison de 7 procaspases 9 pour permettre leur activation. (C) Le complexe DISC est assemblé après liaison du ligand FasL à son récepteur de mort Fas qui permet le recrutement de la protéine FADD et des caspases 8 ou 10 (adapté de Bao et Shi, 2007).

V.2.6.2 Les caspases de classe II

Ce deuxième groupe comprend les caspases 2, 8, 9 et 10 qui possèdent un long prodomaine dans lequel est présent soit un domaine CARD (caspases 2 et 9) soit un domaine DED (caspases 8 et 10). Ces protéases constituent les caspases initiatrices de l'apoptose. La caspase 2 joue un rôle important dans la perméabilité de la membrane mitochondriale et la libération de facteurs apoptotiques en réponse aux dommages à l'ADN. Elle est également activée dans la voie apoptotique extrinsèque qui fait intervenir les récepteurs de mort. L'activation de cette protéine nécessite, elle aussi, l'assemblage d'un complexe protéique d'environ 700 kDa appelé PIDDosome qui comprend la protéine adaptatrice RAIDD et la protéine PIDD (figure 11A). RAIDD possède un domaine CARD qui interagit avec le domaine CARD de la caspase 2 et un domaine DD permettant sa liaison à PIDD.

La caspase 8 est la caspase clé de la voie apoptotique extrinsèque. Elle devient active après formation du complexe DISC (cf. paragraphe II.2.6.6.1 voie extrinsèque ; figure 11C) et elle est régulée par la protéine c-FLIP. La caspase 10 présente une structure très similaire à celle de la caspase 8. Elle est clivée et activée de la même façon que cette dernière. Son rôle exact reste par contre encore incertain.

La caspase 9 est la caspase initiatrice la plus étudiée et son rôle est primordial dans la mort cellulaire programmée impliquant la mitochondrie (cf paragraphe II.2.6.6.2 voie intrinsèque). Son activation passe par la formation de l'apoptosome (figure 11B).

V.2.6.3 Les caspase de classes III

Ce groupe est constitué des caspases présentant un court domaine N-terminal à savoir les caspases 3, 6 et 7. Elles sont appelées caspases effectrices ou exécutrices. Pour être actives, ces protéases doivent être clivées par d'autres caspases. La caspase 3 est la principale caspase effectrice. Elle clive la majorité des substrats de la cellule en cours d'apoptose. Elle est activée par les caspases initiatrices 8 et 9 des voies extrinsèque et intrinsèque. La caspase 7 présente de nombreuses similitudes avec la caspase 3 tant sur le plan structural que fonctionnel ; elles ont donc les mêmes spécificités. Bien que possédant des ressemblances avec les caspases 3 et 7, la caspase 6 agit différemment. Ses cibles seraient réduites à un petit nombre dont la laminine A. Son importance dans l'apoptose semble donc limitée.

V.2.6.4 Les cibles des caspases

Dans les cellules subissant l'apoptose, les caspases ciblent deux types de substrats protéiques : des protéines régulatrices telles que la foldrine, la spectrine ou encore la β -caténine (Saikumar *et al.*, 1999) et des protéines structurales telles les protéines du cytosquelette comme l'actine et les kératines. Récemment, chez le poulet, la titine, la nébuline, la desmine et la troponine-T ont été montrées comme étant des cibles de la caspase 3 (Huang *et al.*, 2009).

V.2.6.5 Fonction des caspases

Il existe deux processus principaux conduisant à la mort cellulaire : la nécrose et l'apoptose. L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée. Cela se traduit par une organisation de la destruction de la cellule et s'accompagne, entre autres, de changements morphologiques avec apparition de « corps » apoptotiques au niveau de la membrane cellulaire. Ces bourgeons sont rapidement éliminés par phagocytose prévenant ainsi tout phénomène d'inflammation.

De nombreuses enzymes sont impliquées dans ce mécanisme. Là où l'apoptose apparaît comme un processus organisé, la nécrose ne l'est pas. Les conséquences sont différentes. Au cours de la nécrose, un gonflement de la cellule et des mitochondries est observé suivi par une rupture de la membrane cellulaire. La libération du contenu cytoplasmique dans le tissu provoque une réaction inflammatoire. L'apoptose est considérée comme un suicide et la nécrose comme un homicide.

L'apoptose est un processus s'opérant dans tous les types cellulaires, dont les tissus post-mitotiques comme le muscle strié squelettique (Marzetti et Leeuwenburgh, 2006 ; Dupont-Versteegden, 2006 ; Argilés *et al.*, 2008).

V.2.6.6 Voies de l'apoptose

Plusieurs voies conduisant à l'apoptose ont été mises en évidence. Les principales sont les voies intrinsèque et extrinsèque (figure 12). Il existe également deux voies mineures qui font intervenir le réticulum endoplasmique et le granzyme B. Des revues récentes décrivent en détail ces différentes voies (Dlamini *et al.*, 2004, Rupinder *et al.*, 2007, Bao et Shi 2007 ; O'Brien et Kirby, 2008, Jeong et Seol, 2008 et Sakamaki et Satou 2009).

V.2.6.6.1 Voie extrinsèque

La voie extrinsèque est déclenchée par différents récepteurs de surface appelés « récepteurs de mort » après stimulation par des ligands « de mort ». Ces récepteurs vont alors activer la cascade des caspases pour aboutir au processus de mort programmée. Les différents récepteurs identifiés appartiennent à la superfamille des facteurs nécrosant des tumeurs (TNF). Fas, encore appelé Apo1 ou CD95, est le mieux caractérisé et son ligand spécifique est FasL (ou CD95L). Ces récepteurs contiennent également dans leur partie intracellulaire un domaine de mort (« Death Domain » ou DD). L'interaction du ligand avec son récepteur conduit à sa trimérisation avec un regroupement des domaines DD. Ceci permet alors la liaison de la protéine adaptatrice FADD à ces domaines. FADD va ensuite recruter la procaspase 8 via leur domaine commun DED. L'ensemble constitue le complexe d'induction du signal de mort (DISC). Après clivage, la caspase 8 active d'autres caspases et des protéines mitochondriales de la voie intrinsèque, ce qui conduit au phénomène d'apoptose.

V.2.6.6.2 Voie intrinsèque

La voie intrinsèque est connue aussi sous le nom de voie mitochondriale. Une grande variété de *stimuli* apoptotiques comme par exemple des dommages de l'ADN, des radiations ultraviolettes ou la présence d'espèces de radicaux oxygénés conduisent à cette voie. Durant ce processus, des protéines pro-apoptotiques vont être libérées de la mitochondrie. Parmi celles-ci, on retrouve le cytochrome c, protéine située dans l'espace inter-membranaire mitochondrial impliquée dans la phosphorylation oxydative. Sept molécules de cytochrome c vont se complexer avec 7 protéines adaptatrices Apaf-1 « Apoptotic protease activating factor 1 » et 7 molécules de procaspase 9 en présence de dATP. L'ensemble forme un complexe appelé l'apoptosome, d'environ 1,4 MDa. Le domaine CARD de Apaf-1 interagit avec le domaine CARD de la procaspase 9. Après clivage de son prodomaine, la caspase 9 induit l'apoptose. D'autres molécules sont également relâchées de la mitochondrie. Ces molécules favorisent l'apoptose (molécules anti-apoptotiques telles que Bcl-2, Bcl-w ou A-1) ou l'inhibent (molécules pro-apoptotiques comme Bid, Bim, Bax, Bmf, Bik ou Bak). Ces différentes protéines sont des membres de la superfamille de Bcl-2 « B-cell lymphoma-2 » et sont situées, pour la plupart, sur la membrane externe de la mitochondrie où

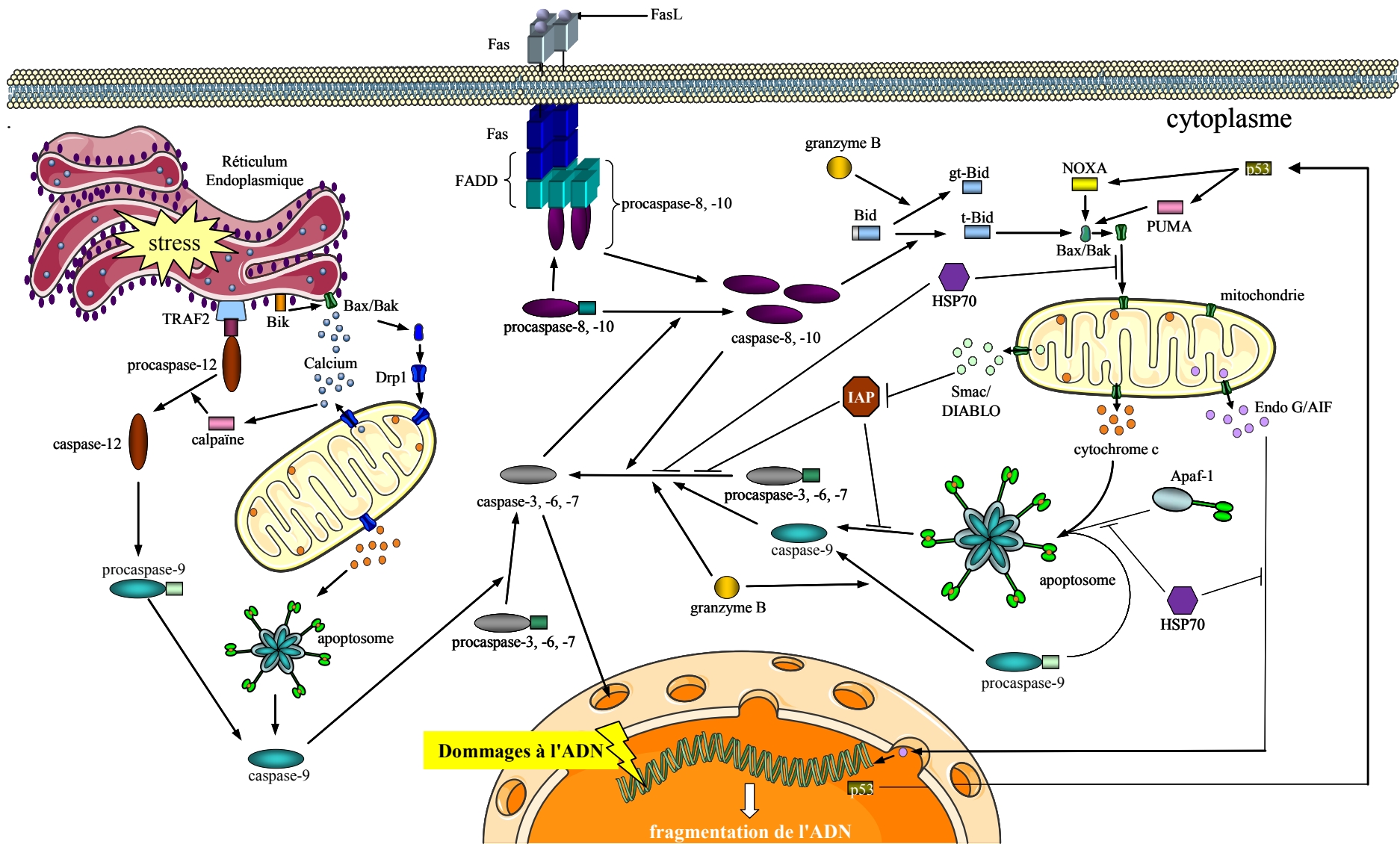


Figure 12 : Représentation schématique des différentes voies de l'apoptose.

elles contrôlent la perméabilité de la membrane par la création de pores ou de canaux ioniques. Les pores formés permettent également la libération, dans le cytosol, de différentes protéines de l'espace inter-membranaire. C'est notamment le cas d'Endo G et d'AIF « Apoptosis-Inducing Factor » qui stimulent la fragmentation de l'ADN lors d'un mécanisme indépendant des caspases ou de Smac/DIABLO qui agit comme un inhibiteur des IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins).

Dans le cytoplasme, la protéine Bid, une fois tronquée par la caspase 8 provoque un changement de conformation du complexe Bax/Bak lui permettant ainsi de se lier à la membrane mitochondriale et de créer un pore facilitant la libération du cytochrome c dans le cytosol. La voie extrinsèque via la caspase 8 et la voie mitochondriale de l'apoptose sont alors déclenchées.

En cas de dommage de l'ADN, le suppresseur de tumeur p53, facteur de transcription qui régule le cycle cellulaire, est capable de déclencher la voie intrinsèque mitochondriale. Cette protéine inhibe la synthèse de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et stimule la synthèse de NOXA (PMAIP1 ou « Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1 ») et de PUMA « p53 Upregulated Modulator of Apoptosis » qui activent ensuite, via Bax, la voie mitochondriale.

V.2.6.6.3 Voie du Réticulum Endoplasmique (RE)

Bien que située dans le cytoplasme, cette voie est indépendante de la voie mitochondriale. Elle survient lorsque le RE est altéré en cas, par exemple, de perturbations des niveaux calciques. Elle implique la procaspase 12. Normalement, cette procaspase est associée au récepteur TRAF2. En cas de stress, une dissociation s'opère et la procaspase 12, après son clivage par les calpaïnes, devient active. La caspase 12 va ensuite cliver la caspase 9 qui, à son tour, active d'autres caspases déclenchant le processus apoptotique. Bien que cette voie soit indépendante de la mitochondrie, Morishima *et al.* (2002) ont montré que, chez la souris, la caspase 12 pouvait provoquer une libération du cytochrome c et donc initier la voie intrinsèque. Cependant chez l'Homme, ce ne serait pas la caspase 12 qui serait impliquée mais la caspase 4 (Hitomi *et al.*, 2004). De plus, après sa fixation au RE, Bik stimule une fuite de calcium, du RE vers le cytosol. Cette augmentation de calcium active la protéine Drp1 responsable de l'accumulation de calcium dans la mitochondrie. L'augmentation du taux calcique mitochondrial entraîne l'ouverture de pores, libérant ainsi du calcium mais aussi des protéines intervenant dans la cascade des caspases.

V.2.6.6.4 Voie du granzyme B

Le granzyme B est une protéase à sérine dont la structure tridimensionnelle rappelle celle de la cathepsine G. Elle possède une spécificité de substrat comparable à celle de la famille des caspases apoptotiques. Elle est ainsi capable de cliver les procaspases 3, 6, 7 et 9. Le granzyme B peut également cliver la protéine pro-apoptotique Bid au niveau du résidu aspartate 75, générant alors la protéine gt-Bid qui migrera vers la mitochondrie où elle pourra recruter Bax et ce, sans intervention des caspases.

V.2.6.7 Apoptose et modifications *post-mortem* du muscle

L'hypothèse de l'implication de l'apoptose dans les modifications *post-mortem* du muscle en viande a été proposée pour la première fois par Ouali *et al.* (2006). Elle a été émise à partir d'un constat simple : la mort de l'animal et l'exsanguination qui s'ensuit provoquent un manque d'oxygène et de nutriments. Le stress engendré va déclencher la mort cellulaire programmée. Ceci sous-entend que les récepteurs de mort intervenant dans la voie extrinsèque ne sont pas impliqués. De plus, aucun phénomène de nécrose *post-mortem* n'a été constaté dans le muscle squelettique bovin. Différentes constatations viennent appuyer cette hypothèse. En premier lieu, lors de la mort cellulaire programmée, une inversion de polarité est observée au niveau de la membrane cellulaire. Cette inversion provient du changement d'orientation de certains constituants de la membrane plasmique. La phosphatidylsérine, un composé acide, qui habituellement se trouve du côté cytosolique, se retrouve sur la face externe de la cellule. A l'inverse, la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine, deux composés basiques, se retrouvent du côté cytosolique. Des translocases « scramblases », « flippases » et « floppases » sont responsables de l'ensemble de ces permutations. La présence de la phosphatidylcholine et de la phosphatidyléthanolamine permet de tamponner le milieu intracellulaire bloquant ainsi temporairement la chute de pH. Ceci expliquerait les différents paliers de diminution du pH observés par Ouali *et al.* (2006) sur du muscle *longissimus* d'animaux Charolais et des muscles de patte arrière d'agneaux, durant les dix premières heures suivant la mort de l'animal.

In vitro, les caspases conservent encore 20 à 50% de leur activité à un pH compris entre 5 et 6 (Stennicke et Salvensen, 1997). Ainsi, les caspases peuvent encore agir dans le muscle *post-mortem* durant les phases de *rigor mortis* et de maturation. L'étude de Pulford *et al.* (2009) a confirmé le déclenchement de l'apoptose à la mort de l'animal. Ces auteurs ont montré, chez des animaux présentant un faible pHu, que l'activité des caspases 3 et 7 était plus élevée

suggérant un taux d'apoptose plus important. Par ailleurs, le taux d'activité de la caspase 9 est deux fois plus élevé que celui de la caspase 8, indiquant que la voie intrinsèque est privilégiée quelque soit le pHu.

Le taux de calcium augmente durant l'installation de l'étape de *rigor mortis*. Cette augmentation est consécutive au relargage du calcium du réticulum endoplasmique des cellules musculaires striées squelettiques (aussi appelé réticulum sarcoplasmique). Cette augmentation du taux calcique permet de déclencher l'apoptose via la voie mitochondriale, d'activer la caspase 12, qui se trouve sur la face externe du réticulum endoplasmique, qui active, à son tour, les caspases effectrices. De plus, l'augmentation du taux de calcium pourrait être responsable de l'exposition de la phosphatidylsérine sur la face externe de la membrane via l'activation des scramblases (Zwaal *et al.*, 2005).

Le déclenchement de l'apoptose via la voie mitochondriale provoque un arrêt de la chaîne respiratoire et donc une perturbation du potentiel redox. Les molécules d'oxygène présentes se transforment en radicaux d'espèces oxygénés (ROS). Cette production augmentée de ROS et la perturbation de l'homéostasie du potentiel redox peuvent provoquer la réduction de groupement thiol des protéines constitutives du pore mitochondrial et leur activation conduisant à la perméabilisation du pore mitochondrial (Crompton, 1999). De plus, dans des carcinomes de colon, les ROS peuvent provoquer des changements de conformation de protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, comme Bax, facilitant la formation de pores dans la mitochondrie (Kim *et al.*, 2004). Stennicke et Salvesen (1999) ont montré que les ROS pouvaient inhiber les caspases par l'oxydation des résidus cystéine. Cependant, il a été montré que le protéasome 20S était fortement impliqué dans la reconnaissance et la dégradation des protéines oxydées (Davies, 2001). La production de ROS va également augmenter celle d'une famille de lipides, les céramides (Quillet-Mary *et al.*, 1997). Cette augmentation de céramides va activer les scramblases, facilitant l'externalisation du phosphatidylsérine (Lang *et al.*, 2005).

Les enzymes lysosomales interviennent également dans l'apoptose. En effet, dans le muscle *post-mortem*, les membranes des lysosomes sont fragilisées et les enzymes libérées, notamment les cathepsines B, L et D (Turk *et al.*, 2001). Ainsi, dans les cellules HeLa, la cathepsine D est capable d'activer différentes protéines des voies apoptotiques. Elle peut cliver les procaspases 9 et 3 et ainsi les activer. De même, elle facilite la libération du cytochrome c dans le milieu cytosolique activant les protéines Bid (qui devient t-Bid) et Bax. La procathepsine D, contenue dans les endosomes, est clivée par les céramides qui assurent également sa libération dans le cytosol (Heinrich *et al.*, 2004).

Il a été montré que les animaux ayant un comportement « excité », c'est-à-dire stressé, présentent une viande plus dure que des animaux au comportement calme (Voisinet *et al.*, 1997 ; King *et al.*, 2006). Pour empêcher que ce stress n'induisse le phénomène d'apoptose, la cellule peut activer des protéines de choc thermique, les HSPs pour « Heat Shock Proteins ». Ce sont des acteurs négatifs dans l'établissement de l'apoptose. Leur action freinerait la mise en place de ce mécanisme, ce qui, pour certains auteurs, expliquerait pourquoi les animaux stressés présentent une viande plus dure. Les travaux de Bernard *et al.* (2007) ont montré une corrélation positive entre une meilleure tendreté et les niveaux transcriptionnels bas des gènes *DNAJ1* et *HSPB1* codant les protéines Hsp40 et Hsp27, respectivement. Cependant, une telle corrélation n'est pas toujours aussi bien établie. Dans l'étude de Morzel *et al.* (2008), une augmentation de la quantité de Hsp27 a été observée dans les viandes les plus tendres. De plus, chez le porc, aucune relation n'a pu être mise en évidence entre la tendreté de la viande et la protéine Hsp70 (van Laack *et al.*, 1993).

Par contre, des changements dans l'activité des caspases 3 et 7 se sont révélés être associés positivement avec le développement d'une viande plus tendre (Kemp *et al.*, 2006). Le fort niveau d'activité de la caspase 9 retrouvé dans les premières heures suivant l'abattage indique que, là aussi, la voie intrinsèque est privilégiée. Enfin, l'étude de Underwood *et al.* (2008) a montré une augmentation de l'activité de la caspase 3 durant la première heure *post-mortem* dans le muscle *longissimus thoracis* bovin. Cependant, les auteurs n'ont pas trouvé de variation d'activité de cette caspase 3 entre des viandes caractérisées par une forte ou une faible force de cisaillement, ce qui ne remet tout de même pas en cause l'existence d'un phénomène apoptotique juste après l'abattage des animaux.

VI. Les inhibiteurs de protéases

L'action des protéases est soumise à une régulation qui module leur activité. Il existe différents types d'inhibiteurs, de nature protéique, spécifiques d'un type de protéases. Cependant, dans certains cas, un même inhibiteur peut agir sur des protéases de classes différentes. L'association enzyme/inhibiteur constitue alors un système protéolytique. Le taux d'inhibiteur protéasique musculaire influence la maturation *post-mortem*: plus l'inhibition est importante et moins la protéolyse des structures myofibrillaires est observée. En fait, c'est le rapport enzyme/inhibiteur qui conditionne le degré d'attendrissage d'une viande.

VI.1 Les inhibiteurs du protéasome

Un des mécanismes d'inhibition du protéasome 20S fait intervenir des molécules qui interagissent avec les sous-unités α du protéasome et qui interfèrent donc avec le pore. Dans d'autres cas, ce sont des inhibiteurs qui modifient le domaine catalytique N-terminal des résidus thréonine. Ces inhibiteurs sont naturels, comme l'époxomicine purifiée des *Actinomycetes*, ou synthétiques. Les peptides synthétiques ayant une fonction aldéhyde, comme le MG132, ou une fonction boronique, comme le bortezomib, forment une liaison covalente hémicétale réversible avec le groupe hydroxyle de la thréonine du site actif (figure 13). Ces peptides sont capables d'inhiber les protéases à sérine et cystéine. Les peptides synthétiques YLVS et NLVS contiennent une fonction vinyl sulfone qui forme une liaison covalente avec le domaine thréonine. L'époxomicine est un inhibiteur fort du protéasome qui forme une structure de type morpholine c'est-à-dire un hétérocycle saturé porteur d'une fonction éther et d'une fonction amine secondaire bloquant ainsi l'accès au pore. Les molécules de la famille des TMC-95s d'*Apiospora montagnei* se fixent au site actif de façon non covalente et sont stabilisées en formant un réseau de liaisons hydrogènes avec des résidus de la poche du substrat (Meiners *et al.*, 2007).

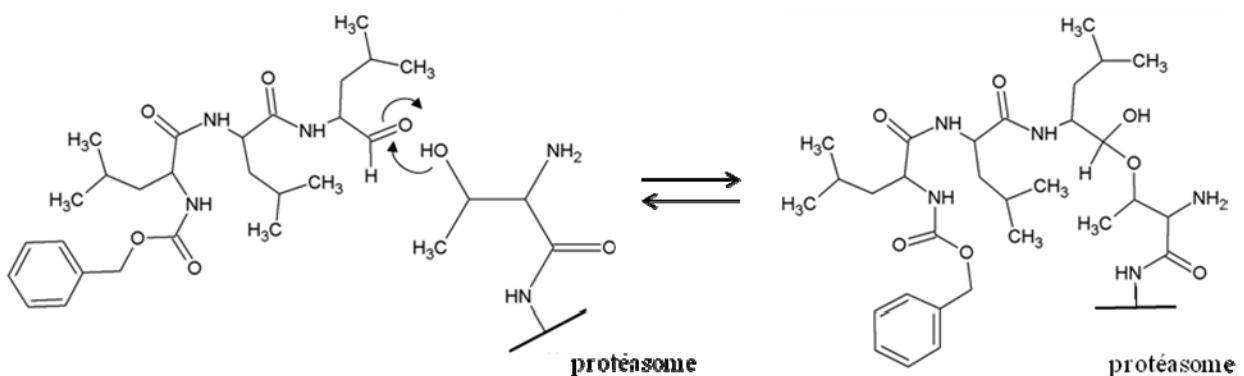


Figure 13 : Inhibition de la thréonine du site actif du protéasome par le MG132. La fonction aldéhyde de l'inhibiteur synthétique permet la formation d'une liaison hémicétale réversible avec le site actif.

VI.2 Les cystatines, inhibiteurs des cathepsines

Les cystatines constituent un groupe important de protéines homologues endogènes qui agissent comme des inhibiteurs réversibles de protéases à cystéine de type papaïne qui appartient aux enzymes de la famille C1 (Rawlings et Barrett, 1990 ; Turk et Bode, 1991 ; Bobek et Levine, 1992). Elles sont divisées en 3 familles distinctes (Turk et Bode, 1991). Les stefines constituent la première famille et comprend notamment les cystatines A et B. Ce sont des polypeptides intracellulaires, non glycosylés d'environ 100 acides aminés qui ne possèdent pas de pont disulfure. Les protéines, appartenant à la deuxième famille, appelées les cystatines, d'environ 120 résidus, sont caractérisées par la présence de deux ponts disulfures conservés en partie C-terminale et d'un peptide signal permettant leur sécrétion. On distingue les cystatines C, D, E/M, F, S, SN, SA. La troisième famille, les kininogènes, est constituée de protéines plasmatiques multifonctionnelles dont la taille varie de 60 à 120 kDa. Elles contiennent 8 ponts disulfures localisés dans 3 domaines cystatines dont 2 possèdent une activité inhibitrice. Cette famille se divise en 3 classes qui diffèrent selon leur masse moléculaire des protéines et leurs cibles. On retrouve ainsi les kininogènes de faible poids moléculaire (L-kininogène), les kininogènes de haut poids moléculaire (H-kininogène) et les kininogènes-T. Toutes les cystatines inhibent les protéases à cystéine telles que la papaïne et les enzymes lysosomales telles que les cathepsines B, H ou L. De plus, certaines kininogènes peuvent inhiber les calpaïnes.

Koohmaraie *et al.* (1991a) ont remarqué qu'entre le bovin, l'agneau et le porc, le taux de cystatines est plus élevé chez ce dernier et que, parmi ces trois espèces, le porc présente également la plus faible diminution de la force de cisaillement durant la maturation. Chez le bovin, différents inhibiteurs de faibles poids moléculaires de protéases à cystéine de type cathepsine ont été purifiés (Ouali *et al.*, 1995 ; Berri *et al.*, 1998 ; Bige *et al.*, 1985). Les cystatines semblent jouer un rôle important car une corrélation négative entre le taux de ces inhibiteurs et la tendreté de la viande a été constatée (Shackelford *et al.*, 1991b). Zeece *et al.* (1992) ont, quant à eux, montré une augmentation de l'activité inhibitrice dans le muscle pectoral de poulet avec un pic à 24 heures *post-mortem*, ce qui suggère un rôle de ces inhibiteurs dans la maturation *post-mortem* du muscle en viande chez cet animal.

VI.3 Les inhibiteurs endogènes des métalloprotéinases

Il existe deux types d'inhibiteurs des MMPs, l' α_2 -macroglobuline et les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMPs pour « Tissue Inhibitor of MetalloProteinases »). L' α_2 -macroglobuline humaine est une glycoprotéine homotétramérique d'environ 720 kDa. Elle est retrouvée dans les fluides et le sang où elle régule principalement l'activité des MMPs. La macroglobuline forme un complexe avec sa cible qui est endocyté via le récepteur LRP-1 (« Low density lipoprotein Receptor-related Protein-1-mediated ») afin d'être dégradé (Strickland *et al.*, 1990). Chez l'Homme, les TIMPs, découverts dans des fibroblastes de tendon et de peau en culture, ont été initialement identifiés comme des inhibiteurs de collagénase (Vater *et al.*, 1979 ; Welgus *et al.*, 1979). Chez l'Homme et le bovin, 4 TIMPs (1 à 4) ont été mis en évidence. Ce sont des protéines homologues de 180 à 190 résidus. Seuls les TIMP1 et TIMP3 sont glycosylés, leur masse variant de 20 à 30 kDa. Ces protéines sont organisées en 2 grands domaines N et C terminaux, chacun possédant 6 résidus cystéine formant 3 ponts disulfures dans le cas de TIMP1 (Williamson *et al.*, 1990). Le domaine N-terminal semble par ailleurs être suffisant pour l'inhibition (Murphy *et al.*, 1991). L'analyse cristallographique du complexe TIMP-1/MMP-3 a permis de mieux cerner le mécanisme d'inhibition (Gomis-Rüth *et al.*, 1997, figure 14).

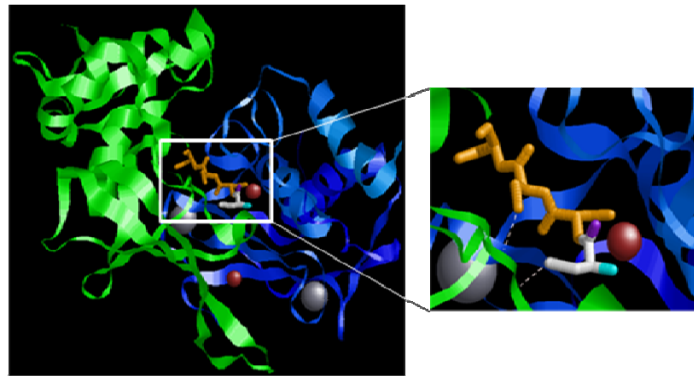
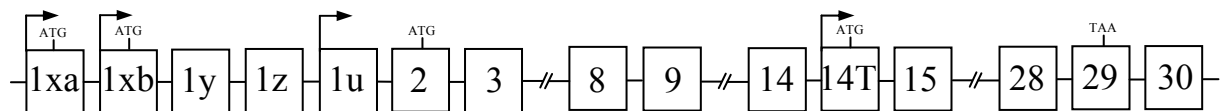


Figure 14 : Structure du complexe MMP-13 (en bleu) et TIMP-2 (en vert). Les atomes de zinc et de calcium sont en rouge et gris, respectivement. En blanc et jaune sont représentés les résidus (cystéine 1 et sérine 2, cystéine 3 et sérine 4, respectivement) s'insérant dans le site actif de la métalloprotéase. Les deux groupements amine et carboxyle sont en cyan et violet, respectivement. Les pointillés correspondent aux ponts disulfures entre les cystéines 1-127 et 3-97 (PDB 2E2D).

A



B

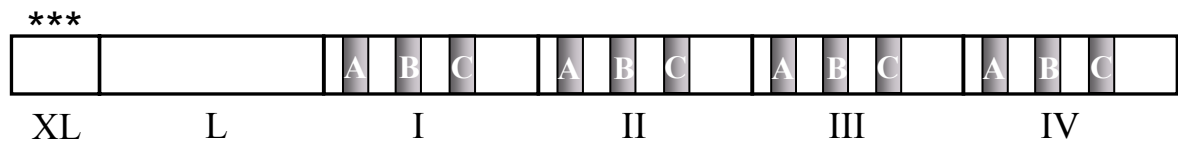


Figure 15 : La calpastatine bovine. (A) le gène de la calpastatine est constitué de 30 exons. Les différents sites de début de transcription sont symbolisés par une flèche et les codons d'initiation ATG et de terminaison de la traduction TAA sont indiqués. (B) la calpastatine bovine contient 6 domaines, XL, L, I, II, III et IV. Dans les 4 derniers domaines, on trouve 3 sous-domaines (A, B et C) indispensables à l'activité inhibitrice. Les astérisques situés dans le domaine XL correspondent aux 3 sites de phosphorylation de la calpastatine (d'après Raynaud et al., 2005).

L'extrémité N-terminale de TIMP1, stabilisée par la formation d'un pont disulfure entre les résidus cystéines 1 et 70, s'insère dans le site actif de MMP-3. Les groupements amine et carbonyle de la cystéine 1 vont chasser la molécule d'eau liée à l'atome de zinc, et nécessaire à la catalyse, bloquant alors toute réaction enzymatique. Dans le cas du complexe collagénase-3 (MMP-13)/TIMP-2, on note le même mécanisme d'insertion d'un segment dans le site catalytique de la métalloprotéinase. Les déformations occasionnées provoquent cependant une légère rotation de l'inhibiteur, d'environ 20° (figure 14). Ceci semble suggérer qu'en fonction de la cible protéasique, l'orientation de l'insertion du fragment N-terminal de l'inhibiteur va varier, ce qui déterminera le positionnement de cet inhibiteur vis-à-vis de la protéase (Maskos *et al.*, 2007).

VI.4 La calpastatine, inhibiteur des calpaïnes

La calpastatine (codée par le gène *CAST*) est l'inhibiteur réversible spécifique des calpaïnes ubiquitaires 1 et 2 (Maki *et al.*, 1988). Il existe différentes isoformes dont la taille varie de 65 kDa à plus de 172 kDa et divisées en 2 sous-groupes : le type court de 65 à 70 kDa et le type long de 107 à 170 kDa. Ces isoformes sont traduites à partir de différents transcrits, dont l'extrémité 5' varie. L'expression du gène *CAST* est complexe. Il est sous la dépendance de plusieurs promoteurs qui génèrent différents transcrits soumis à des épissages alternatifs. Quatre transcrits ont été identifiés chez le bovin, dont un spécifique du testicule (Raynaud *et al.*, 2005). La protéine bovine est constituée de 4 domaines inhibiteurs homologues situés en position C-terminale, un domaine non-inhibiteur L (pour « Leader »), dont la fonction n'est pas clairement établie, et un domaine XL du côté N-terminal possédant 3 sites de phosphorylation (figure 15). Ce dernier domaine est spécifique du bovin, il est codé par 5 exons appelés 1xa, 1xb, 1y, 1z et 1u (Cong *et al.*, 1998). A l'intérieur de chaque domaine I, II III et IV se trouvent 3 sous-domaines A, B et C nécessaires à l'activité inhibitrice calcium dépendante. (Cottin *et al.*, 1981). Chacun de ces sous-domaines se fixe sur un domaine spécifique de la calpaïne. Ainsi, les sous-domaines A et C se fixent respectivement aux domaines IV, VI et le sous-domaine B dans une zone au voisinage du site actif. La calpastatine peut potentiellement inhiber 4 molécules de calpaïnes (Goll *et al.*, 2003). La structure cristallographique du complexe formé entre la calpaïne 2 et les résidus 134 à 219 du domaine I de la calpastatine a permis de mieux appréhender le mécanisme d'action de cet inhibiteur (Moldoveanu *et al.*, 2008 ; figure 16).

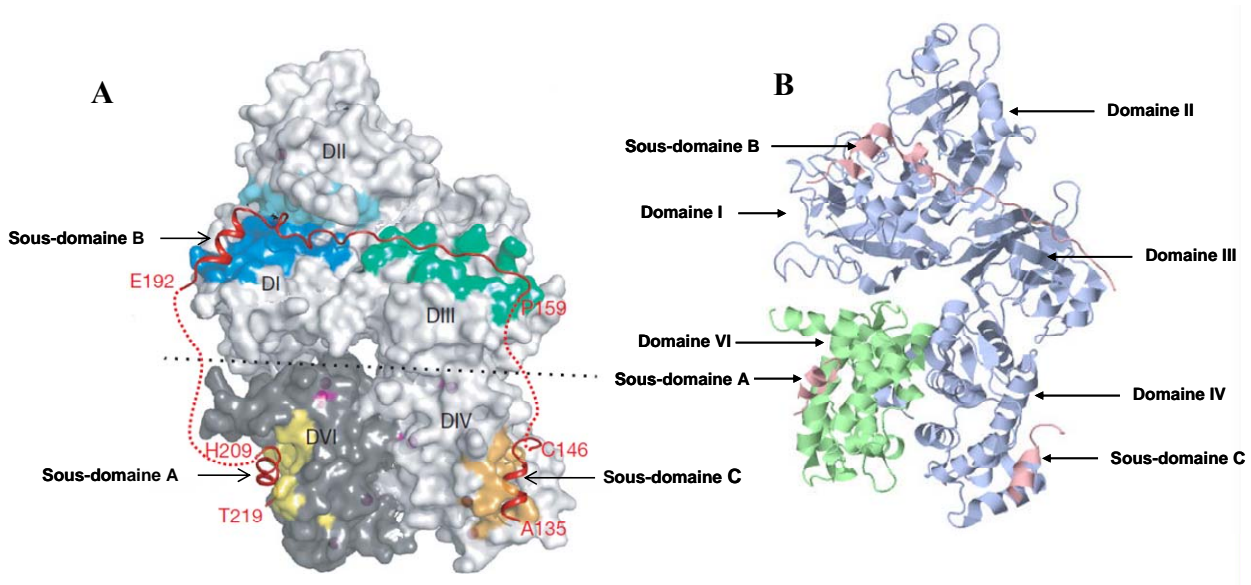


Figure 16 : Représentation tridimensionnelle en sphères (A) et en ruban (B) du complexe m-calpaïne ayant fixé les ions calcium et la calpastatine. Seuls les sous-domaines, en hélice rouge, avec les résidus les délimitant sont affichés ; le reste du domaine est représenté en pointillé rouge. Les sous-domaines A et C se lient aux domaines VI et IV (DIV et DVI, respectivement) en formant une hélice. Le sous-domaine B se répartit sur les domaines DI, DII et DIII. Il bloque le site actif en formant une boucle afin d'éviter son clivage. Le reste du sous-domaine interagit avec le domaine DIII par des liaisons hydrophobes afin de stabiliser l'ensemble. Les ions calcium sont représentés par des sphères violettes (d'après Moldoveanu et al., 2008).

Après leur fixation aux régions « EF-hand » (et après fixation du calcium) des domaines IV et VI de la calpaïne, les sous-domaines A et C adoptent une structure en hélice amphipathique. Le sous-domaine B s'associe aux domaines I à III pour obstruer le site catalytique de la calpaïne. Plus précisément, le sous-domaine B s'ancre de part et d'autre de la cystéine du site actif sans être clivé par cette dernière et en formant une boucle. Cependant, d'après Doumit et Koohmaraie (1999), dans le muscle *post-mortem*, la calpastatine serait dégradée par les calpaïnes. Cette observation est contredite par l'étude cristallographique. La calpastatine pourrait donc être dégradée par un autre type de protéases comme les caspases. De nombreuses études ont montré que la calpastatine est un régulateur de la tendreté (Morton *et al.*, 1999). Chez l'agneau callipyge, le fort taux de calpastatine provoque une diminution importante de la vitesse et de l'étendue de la protéolyse *post-mortem* (Koohmaraie *et al.*, 1995 ; Geesink et Koohmaraie, 1999b). L'administration, à des veaux, d'agonistes β -adrénergiques provoque une augmentation de la force de cisaillement. Cette augmentation serait liée au taux de calpastatine plus élevé chez ces animaux que chez des animaux non traités. Le même constat a été fait chez des agneaux châtrés avec un autre agoniste, le L-644,969 (Koohmaraie *et al.*, 1991b ; Garssen *et al.*, 1995). Par ailleurs, une corrélation positive a été établie entre la calpastatine et la force de cisaillement chez des bovins hypermusclés de race Blanc Bleu Belge (Steen *et al.*, 1997). De plus, des vitesses de protéolyse variables sont observées chez des espèces différentes bovine, ovine ou porcine mais aussi au sein d'une même espèce, comme chez les races *Bos taurus* et *Bos indicus*. Dans tous les cas, une diminution de la vitesse de protéolyse est corrélée à une augmentation de l'activité de la calpastatine (Ouali et Talmant, 1990 ; Whipple *et al.*, 1990 ; Koohmaraie *et al.*, 1991a ; Shackelford *et al.*, 1991a ; Ibrahim *et al.*, 2008).

De plus, des souris transgéniques surexprimant le gène de la calpastatine humaine présentent une forte réduction de la lyse des protéines musculaires (Kent *et al.*, 2004). Shackelford *et al.* (1994) ont montré une corrélation phénotypique et génétique positive entre l'activité de la calpastatine bovine musculaire 24 heures après abattage et la force de cisaillement lors du conditionnement, qui expliquerait jusqu'à 40% des variations observées entre les races testées. Chez le porc également, un taux protéique et une activité élevée de la calpastatine sont associées à une augmentation de la dureté de la viande (Sensky *et al.*, 1996 ; Parr *et al.*, 1999).

VI.5 Les inhibiteurs de caspases

Les facteurs anti-apoptotiques les plus étudiés sont les membres de la famille Bcl-2. Cependant, d'autres régulateurs existent dont ceux qui modulent l'activité des caspases.

VI.5.1 Les IAPs, pour *Inhibitors of Apoptosis Proteins*

Les IAPs représentent un groupe de protéines cytosoliques, structurellement très proches, capable d'inhiber les caspases. Ils ont été identifiés, pour la première fois, chez les baculovirus. Cependant, ils sont également présents chez la drosophile et les mammifères. Chez ces derniers, 8 IAPs ont été caractérisés : XIAP, c-IAP1, c-IAP2, ML-IAP/Livin, ILP2, NAIP, Bruce/Apollon et Survivin, et uniquement 2 chez la drosophile : Diap1 et Diap2. Parmi ces IAPs, c-IAP1, c-IAP2, NAIP et XIAP sont capables d'inhiber les caspases 3 et 7 alors que seul XIAP inhibe la caspase 9 (Kumar, 2007). Les IAPs sont caractérisés par la présence de domaines BIR pour « Baculovirus IAP Repeat » qui sont des domaines de fixation du zinc d'environ 80 acides aminés. XIAP, c-IAP1 et c-IAP2 possèdent 3 domaines BIR qui assurent des fonctions distinctes. Pour XIAP, le troisième domaine répété, BIR3, intervient dans l'inhibition de la caspase 9, alors que la région située entre BIR1 et BIR2 leur permet d'inhiber les caspases 3 et 7. XIAP utilise donc 2 mécanismes pour inhiber ces trois caspases. Lorsque la voie apoptotique intrinsèque est activée, la protéine Smac/DIABLO sort de la mitochondrie et inactive XIAP par inhibition compétitive, en mimant un tétrapeptide porté par la caspase 9, cible de XIAP (Hinds *et al.*, 1999 ; Shi, 2002 ; O'Riordan *et al.*, 2008).

VI.5.2 Les autres inhibiteurs des caspases

Les baculovirus sont de gros virus à ADN double brin qui induisent l'apoptose chez les insectes. Afin d'empêcher la mort de la cellule infectée, le baculovirus a synthétisé, en plus des IAPs, deux protéines, P35 et P49. P35 est capable d'inhiber les caspases effectrices alors que P49 inhibe à la fois les caspases initiatrices et effectrices. P49 agit sous forme d'homodimère alors que P35 fonctionne sous forme monomérique (Bump *et al.*, 1995 ; Lannan *et al.*, 2007 ; Guy et Friesen, 2008). P35 inhibe la caspase 8 après formation d'un complexe covalent, comme cela a été observé pour les serpinines vis-à-vis de leurs cible (Xu *et al.*, 2001). Dans le virus cowpox, la serpinine CrmA pour « Cytokine response modifier A » inhibe les caspases 1 et 8 et, dans une moindre mesure, les caspases 3 et 6 (Dobó *et al.*, 2006 ; Zhou *et al.*, 1997). Chez la souris atteinte d'emphysème, les études réalisées, *in vitro* et *in vivo*, sur l' α_1 -antitrypsine ont montré que cette serpinine, en se fixant de façon non covalente à

la caspase 3, était capable de l'inhiber. Elle empêche donc l'apoptose des cellules endothéliales de poumon (Petrache *et al.*, 2006). Enfin, l'inhibiteur de protéinase 9 (PI9), une serpine placentaire, est capable, *in vitro*, d'inhiber les caspases 1, 4 et 8 mais pas la caspase 3 (Annand *et al.*, 1999). Cet inhibiteur a pour particularité de posséder un résidu glutamate à la place du résidu aspartate dans le site de reconnaissance et de clivage des caspases ; toutefois, il inhibe plus efficacement les caspases lorsque ce résidu glutamate est remplacé par un résidu aspartate (Bird *et al.*, 1998).

Tableau VII : Les inhibiteurs de protéases à sérine.

Nom de la famille	Numéro de la famille dans la base MEROPS
Type Kunitz	I3
Type Kazal	I1
Type Soybean	I3
Type SSI (Streptomyces Subtilisin Inhibitor)	I16
Type Potato Inhibitor 1	I13
Type Potato Inhibitor 2	I20-I13
Chelonianin (Mucous proteinase inhibitor)	I1-I17
Type Bowman-Birk	I12
Serpines	I4
Hirudine	I14

Tableau VIII : Les clades des serpines.

Lettre du Clade	Nom du Clade*
A	Inhibiteur de l' α 1-protéinase, α 1-antitrypsine ou A1AT (SERPINA1)
B	Ovalbumine (SERPINB1)
C	Antithrombine III ou ATIII (SERPINC1)
D	Héparine Cofacteur II ou HCII (SERPIND1)
E	Inhibiteur de l'Activateur du Plasminogène 1 ou PAI-1 (SERPINE1)
F	α 2-antiplasmine ou α 2-AP (SERPINF2)
G	Inhibiteur du facteur C1 du complément (SERPING1)
H	Heat Shock Protein 47 ou HSP47 (SERPINH1)
I	Neuroserpine (SERPINI1)
J	Limule
K	Insecte
L	Nématode
M	Schistosome
N	Protéines virales de type SPI1-2
O	Protéines virales de type SPI1-3
P	Plantes

* souvent le clade porte le même nom que son premier membre

VII. Les inhibiteurs de protéases à sérine

VII.1 Classification

Les inhibiteurs de protéases à sérine ont été d'abord étudiés dans le plasma sanguin (Travis et Salvesen, 1983) avant de l'être dans d'autres tissus ou organismes. Ainsi, les inhibiteurs de protéases à sérine sont répartis en 10 familles issues du nom du découvreur ou du nom du premier inhibiteur décrit. Parfois, dans la base MEROPS, les membres de ces familles sont parfois dissociés ou regroupés en deux familles (tableau VII).

VII.2 Les serpinines

Les serpinines, acronyme pour « *serine protease inhibitors* », constituent la plus grande famille d'inhibiteurs de protéases à sérine. Selon la base MEROPS, les serpinines font partie de la famille d'inhibiteur I₄ (Rawlings *et al.*, 2004a, b). A ce jour, plus de 1500 serpinines ont été dénombrées. A l'instar des protéases à sérine, les serpinines sont retrouvées chez les eucaryotes, les procaryotes, les virus et plus récemment chez les champignons (Steenbakkers *et al.*, 2008). En se basant sur leurs homologies de séquence, les serpinines ont été initialement divisées en deux groupes, les *ov*-serpinines intracellulaires, homologues à l'ovalbumine de poulet et les serpinines extracellulaires. Par analyse phylogénétique, Irving *et al.* (2000) ont classé les serpinines en 16 clades (de A à P). Ceci a permis de définir la nomenclature aujourd'hui usitée et s'écrivant sous la forme SERPINX_y, X correspondant au clade et y indiquant le nombre au sein de ce clade (tableau VIII, Silverman *et al.*, 2001). Chez l'Homme, environ 40 serpinines ont été répertoriées dont la majorité appartient aux clades A ou B (Gettins, 2002a). Chez les vertébrés, une analyse phylogénétique, réalisée à partir de 110 séquences de serpinines, et s'appuyant sur les séquences protéiques et l'organisation structurale de leur gène, a confirmé la répartition en 6 groupes : ovalbumine, α_1 -antitrypsine, neuroserpine, α_2 -antiplasmine, antithrombine III et HSP47 (Ragg *et al.*, 2001). Seul le groupe de l'ovalbumine a été scindé en 2 sous-groupes, les exons 3 et 4 n'en formant plus qu'un seul dans le deuxième sous-groupe (Atchley *et al.*, 2001). Enfin, aucune preuve n'existe concernant un transfert horizontal des gènes de serpinines. Il s'agirait de protéines anciennes dont la plupart des procaryotes auraient perdu l'usage (Roberts *et al.*, 2004).

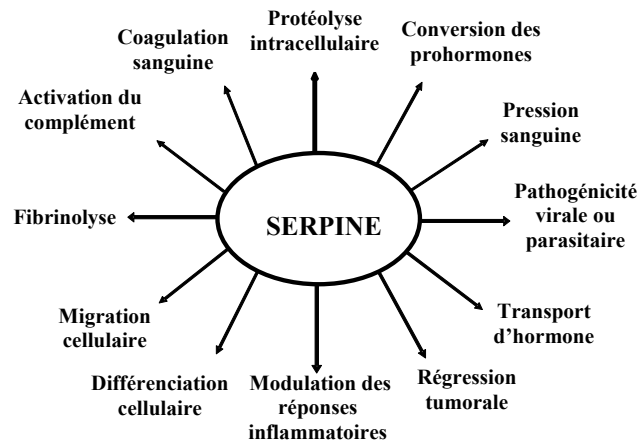


Figure 17 : Rôles biologiques des serpinés (d'après Potempa et al., 1994)

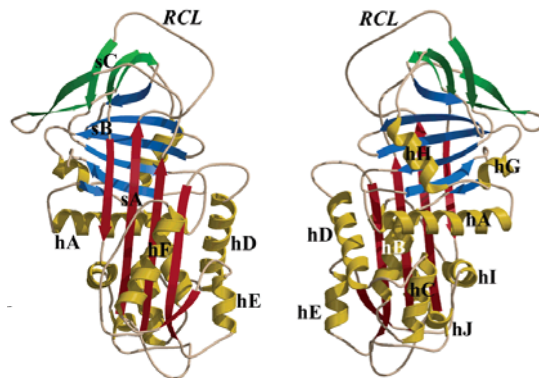


Figure 18 : Représentation tridimensionnelle d'une serpine native vue de l'avant (à gauche) et vue de l'arrière (à droite). Les brins des feuilletés β A (sA), B (sB) et C (sC) sont colorés en rouge, bleu et vert, respectivement. Les 9 hélices A à J (hA à hJ) sont en jaune. (Gettins, 2002a).

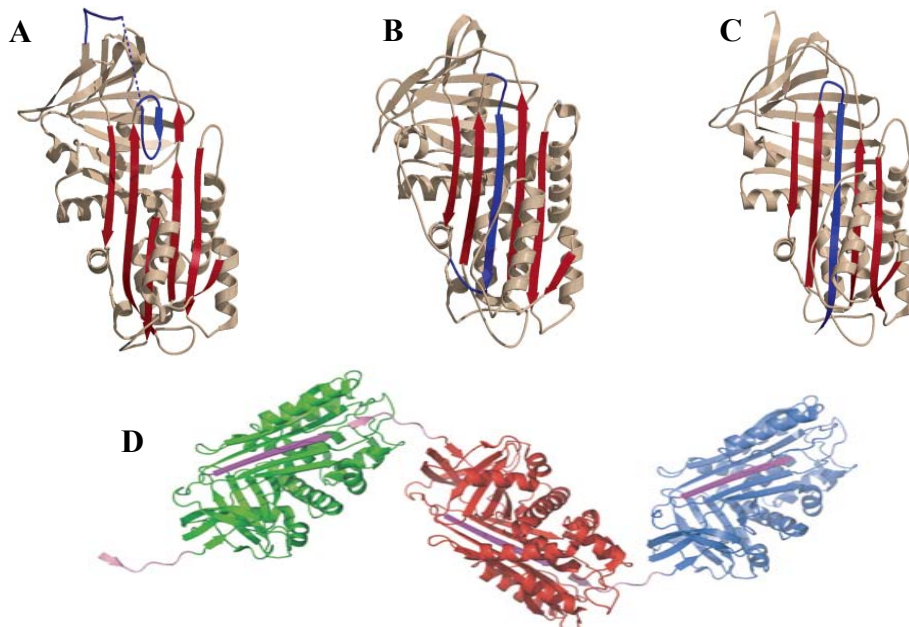


Figure 19 : Représentation structurale des conformations δ (A), latente (B), clivée (C) et polymérique (D). Dans la conformation δ , le RCL (en bleu) est partiellement inséré dans le feuillet β A (en rouge). La forme latente présente un RCL inséré dans le feuillet β sans avoir subi de clivage. Dans la forme clivée, la serpine présente la même conformation que dans la forme latente avec un RCL clivé. La forme polymérique (D) est une répétition d'unités dans laquelle le RCL d'un monomère d'une serpine est retrouvé dans le feuillet β d'une autre serpine (Gettins, 2002a).

VII.3 Fonctions biologiques des serpinines

Les serpinines sont impliquées dans un très grand nombre de fonctions biologiques (figure 17, Potempa *et al.*, 1994). Chez l'Homme, la plupart d'entre elles inhibent leur protéase cible (van Gent *et al.*, 2003). Parmi les serpinines inhibitrices, la SERPINA4 (PI4) est un inhibiteur de la kallikréine qui participe à la modulation de la réponse inflammatoire, la SERPINF2 (α 2-antiplasmine) intervient lors de la fibrinolyse, la SERPINC1 (antithrombine III) régule la coagulation sanguine et la SERPINB10 intervient dans la condensation de la chromatine (MENT ; Irving *et al.*, 2002). Cependant, certaines serpinines sont non inhibitrices ; la SERPINA8, par exemple, est une globuline fixant le cortisol qui intervient dans le transport d'hormones. Chez les virus, elles semblent impliquées dans l'inhibition de l'apoptose. C'est le cas de CrmA (« Cytokine response modifier A ») précédemment décrite. Chez la drosophile, une serpinine (Spn27A) participe à la formation de l'axe dorso-ventral lors du développement larvaire (Ligoxygakis *et al.*, 2004). Chez les plantes, bien que des serpinines aient été identifiées leurs rôles exacts restent encore incertains ; la serpinine CmPS de potiron semble réguler la réponse immunitaire après infection parasitaire (Yoo *et al.*, 2000). Enfin, chez les procaryotes, leurs cibles et leurs fonctions biologiques restent à approfondir.

VII.4 Structure des serpinines

Les serpinines sont des protéines *N*-glycosylées et/ou phosphorylées constituées de 350 à 500 résidus. Si leur composition en acides aminés diffère, elles conservent toutes, et de façon remarquable, une même structure tridimensionnelle. Ainsi, une serpinine est constituée de 3 feuillets β (A, B et C), le feuillet A étant composé uniquement de 5 brins, et de 8 ou 9 hélices α (hA à hI) (figure 18). Elles possèdent, à leur extrémité C-terminale, une séquence mobile d'environ 20 résidus reconnue par la protéase cible et appelée RCL, pour « Reactive Center Loop » ou RSL pour « Reactive Site Loop ». Cette conformation native ou « stressée, S » est très instable sur le plan thermodynamique. Lorsque la protéase se fixe sur le RCL, celui-ci s'insère dans le feuillet β A, formant ainsi le quatrième brin (s4A). La serpinine adopte alors une conformation « relaxée, R » beaucoup plus stable, le gain d'enthalpie libre ΔG pouvant atteindre -32,2 kcal/mol (Im *et al.*, 2000). Des études cristallographiques ont montré que les serpinines peuvent adopter d'autres conformations : latente, clivée, δ et polymérisée (figure 19, Whisstock *et al.*, 1998 ; Dafforn *et al.*, 2004 ; Marszal et Shrake, 2006). La forme latente est une forme non clivée dans laquelle le RCL vient s'insérer dans le feuillet β de la serpinine. L'existence d'une telle structure a permis de montrer la capacité du

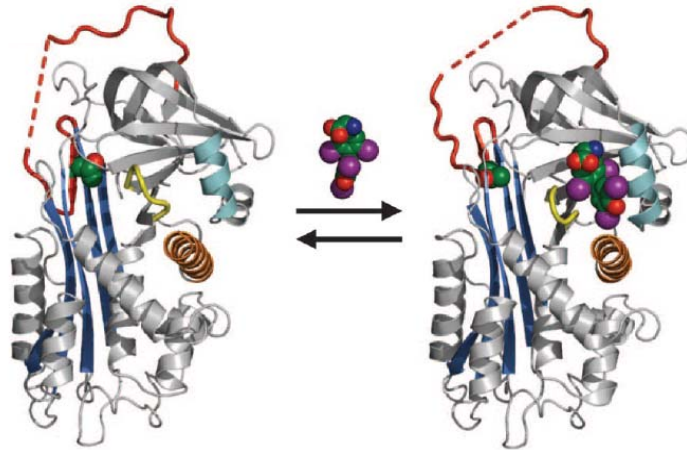


Figure 20 : Représentation schématique de l'équilibre dynamique de la thyroglobuline s'opérant entre la liaison et la libération de la thyroxine. La structure de la TBG non liée à l'hormone (à gauche) est basée sur la conformation δ de l' α_1 -antichymotrypsine. On observe une insertion partielle du RCL dans le feuillet β A. Le résidu P14 (sphères verte et rouge) montre la déformation subie par le RCL qui ressort lors de la fixation de l'hormone (à droite). D'après Zhou et al. (2006).

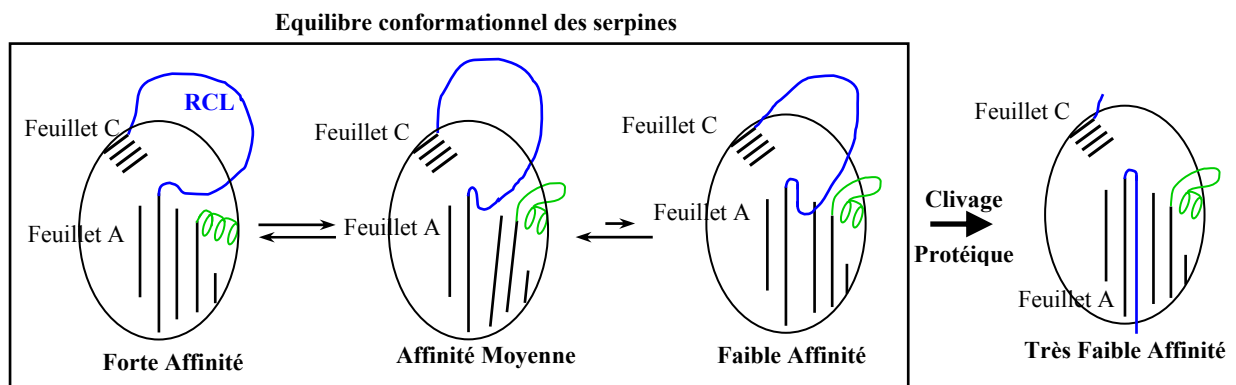


Figure 21 : Mécanisme d'action des serpinines transporteuses d'hormones CBG et TBG (adapté de Zhou et al., 2008). Lors d'une lésion, un échauffement local se produit ce qui va provoquer l'ouverture du feuillet A, la déstructuration de l'hélice hD (vert) et l'insertion partielle du RCL (bleu). Il s'ensuit alors la libération du cortisol. L'importance de l'insertion du RCL va définir l'affinité de la serpinine pour l'hormone. Un équilibre dynamique s'opère entre les différentes formes. Lors du clivage protéolytique, la serpinine adopte une conformation relaxée irréversible avec une affinité pour l'hormone très faible. Les premiers stades sont à l'équilibre tandis que le dernier est définitif.

RCL à venir s'insérer dans le feuillet β A. La serpine circulante PAI-1 adopte cette conformation de façon spontanée, ce qui prolonge sa demi-vie (Mushunje *et al.*, 2004). La forme clivée est une forme latente dans laquelle seule la partie clivée du RCL s'insère dans le feuillet β A. Dans la conformation δ , un fragment du RCL s'insère à une extrémité du feuillet β A et un fragment de l'hélice F s'insère à l'autre extrémité. Cette conformation a été retrouvée dans un variant de l' α_1 -antichymotrypsine (Gooptu *et al.*, 2000). Le conformère δ peut ainsi être considéré comme un intermédiaire entre les formes native et latente. Enfin, la forme polymérisée correspond à un enchaînement de plusieurs molécules de serpinés dans lequel le RCL d'un monomère est complètement inséré dans le feuillet β A du monomère suivant. Cette structure est rencontrée pour un mutant de l' α_1 -antitrypsine (Seyama *et al.*, 1991).

Les serpinés, transporteuses d'hormones, illustrent de façon remarquable les changements conformationnels adoptés par ces protéines (figure 20). La thyroxine (T4 ou tétraiodothyronine) et les corticoïdes sont des hormones transportées dans le sang et libérées dans les tissus par la thyroxine-binding globulin (TBG) et la transcortine (CBG), deux serpinés non inhibitrices. L'analyse cristallographique de ces deux protéines a permis de mieux comprendre leur fonctionnement. Pour exemple, lors de la capture de l'hormone, la serpine TBG adopte une conformation δ partielle dans laquelle seuls deux résidus du RCL sont insérés dans le feuillet β A. Pour permettre la libération de l'hormone, la serpine adopte une conformation δ dans laquelle les 4 résidus du RCL sont insérés dans le feuillet β A (figure 20). Ainsi, les auteurs suggèrent que l'équilibre dynamique, existant entre la forme partiellement insérée et la conformation δ , est lié à la capture ou à la libération de la thyroxine (Zhou *et al.*, 2006). De manière mécanistique (figure 21), l'affinité pour l'hormone est maximale lorsque le RCL n'est pas inséré dans le feuillet β A et quand l'hélice hD n'est pas débobinée. En cas d'insertion partielle du RCL, accompagnée d'une distorsion de l'hélice hD, l'affinité de la serpine pour l'hormone diminue (état intermédiaire). Plus le RCL s'insère, plus l'affinité diminue. Lorsque l'insertion est complète, après clivage protéolytique de la serpine, celle-ci adopte une conformation relaxée irréversible avec une affinité pour l'hormone très faible (Zhou *et al.*, 2008a). L'existence d'une telle structure a permis de montrer la capacité du RCL à venir s'insérer dans le feuillet β A.

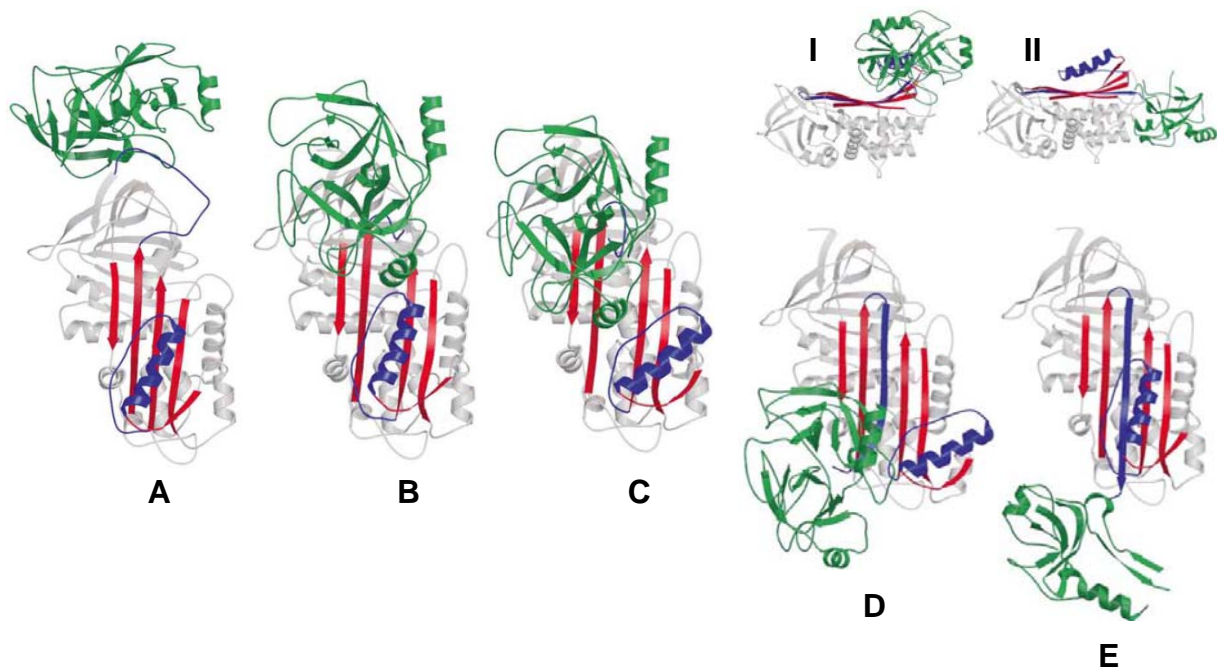
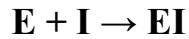


Figure 22 : Représentation schématique du complexe serpine/protéase à sérine. (A) la protéase cible (en vert) se fixe au niveau du site de reconnaissance situé sur le RCL (en bleu) de la serpine (en gris). (B) après clivage et formation de la liaison covalente irréversible, quelques résidus du RCL s'introduisent dans le feuillet βA (en rouge) de la serpine, entraînant avec elle la protéase cible. (C) l'hélice F (en bleu) se déplace légèrement afin de permettre la progression du RCL dans le feuillet ainsi que le basculement de la protéase. (D) déplacement complet de l'hélice F accompagné de la distorsion du site catalytique de la protéase. (E) formation finale du complexe avec retour à sa position initiale de l'hélice F, basculement total de la protéase et compression de cette dernière, la rendant inactive. Les structures I et II sont les vues latérales des structures D et E, respectivement, dans lesquelles le mouvement de l'hélice F est remarquable (d'après Gettins, 2002b).

VII.5 Mécanisme d'inhibition des serpins

Les serpins inhibent leurs protéases cibles par un mécanisme de substrat suicide qui conduit à la formation d'un complexe irréversible. Pour ce type de mécanisme, la réaction peut s'écrire :



Les serpins présentent un mécanisme d'inhibition spécifique (figure 22). Au début de la réaction, la protéase (E) forme avec l'inhibiteur (I) un complexe (EI) non covalent de type Michaelien via des interactions avec les acides aminés situés autour du site de coupure P1-P1' du RCL, où P1 est le résidu après lequel la protéase clive l'inhibiteur et libère le fragment C-terminal P'1 à P'x. La sérine 195 du site actif de la protéase attaque la liaison peptidique située entre les résidus P1 et P1', formant ainsi une liaison acyl ester covalente entre la sérine et la fonction carbonyle du résidu P1. Après le clivage de la serpine et la formation d'une liaison covalente, le complexe formé devient stable thermodynamiquement ([EI']). La serpine passe de la conformation (S) à la conformation (R) plus stable thermodynamiquement. Le RCL s'insère dans le feuillet β A et entraîne la protéase liée de façon covalente. L'insertion complète du RCL permet le basculement de la protéase de 70 Å à l'autre extrémité de la serpine. Ce mouvement provoque une libération d'énergie. En parallèle, l'hélice hF se déplace pour permettre l'insertion du RCL (Gettins, 2002b). Le basculement provoque une distorsion du site actif de la protéase cible due à sa compression. L'enzyme peut perdre jusqu'à 37% de sa taille. La poche catalytique formée par la triade (cf figure 6) est déstabilisée empêchant ainsi la fin de la catalyse et la libération du substrat (Huntington *et al.*, 2000).

Cependant, dans certains cas, la protéolyse de la serpine peut se poursuivre avant ou pendant l'insertion de la protéase et conduire ainsi à la libération de la protéase cible intacte (E) et de la serpine clivée (I*). Ainsi, le mécanisme d'action des serpins peut être écrit selon le schéma réactionnel suivant :

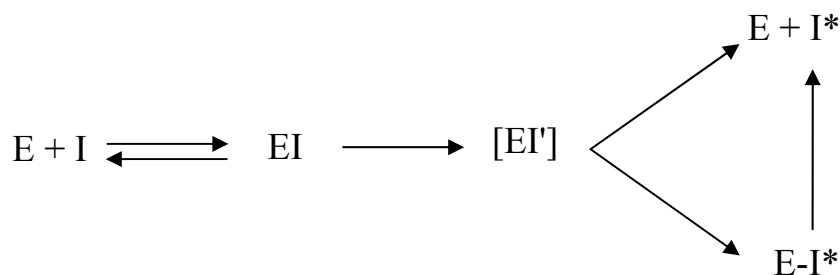


Tableau IX : Exemples de protéases à cystéine inhibées par des serpins.

Nom de la serpine (organisme)	Protéase à cystéine cible	Références
Serpin1 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	métacaspase 9 (AtMC9)	Bozhkov <i>et al.</i> , 2005 Vercammen <i>et al.</i> , 2006 Helmersson <i>et al.</i> , 2008
CrmA (virus <i>Cowpox</i>)	Caspases 1, 3, 6 et 8	Zhou <i>et al.</i> , 1997 Renucci <i>et al.</i> , 2000 Dobó <i>et al.</i> , 2006
SCCA1 ou « Squamous Cell Carcinoma Antigen 1 » (<i>Homo sapiens</i>)	Papaïne Cathepsines L, S et K	Schick <i>et al.</i> , 1998
α 1-antichymotrypsine (<i>Bos taurus</i>)	Prohormone Thiol Protease (PTP)	Hook <i>et al.</i> , 1993
bovSERPINA3-7 (<i>Bos taurus</i>)	Papaïne	Hwang <i>et al.</i> , 2002
SRP-2 (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	Cathepsines K, L, S et V	Pak <i>et al.</i> , 2004
Inhibiteur de protéinase 9 ou PI9 (<i>Homo sapiens</i>)	Caspases 1, 4 et 8	Annand <i>et al.</i> , 1999

VII.6 Inhibition croisée ou « cross-class inhibition » et inhibition réversible

Bien que les serpins soient, en premier lieu, des inhibiteurs de protéases à sérine, certaines sont également capables d'inhiber des protéases à cystéine. Ce phénomène est décrit sous le terme d'inhibition croisée ou « cross-class inhibition ». Différents exemples ont été décrits dans la littérature et sont répertoriés dans le tableau IX.

Certaines serpins inhiberaient les protéases à cystéine selon un mécanisme irréversible similaire à celui mis en place pour les protéases à sérine. Elles formeraient un intermédiaire réactionnel thioacyl, permettant l'insertion du RCL lié à l'enzyme, la compression de la protéase et la modification de son site catalytique. Une liaison covalente entre la serpine CrmA et les caspases 1, 6 et 8 a été confirmée par l'étude de Dobó *et al.* (2006). Cette liaison ne concerne qu'une des 2 sous-unités p20 de la caspase.

VII.7 Autres mécanismes d'inhibition des serpins

Certaines serpins inhibent des protéases cibles de manière réversible. Ainsi, chez la souris, la serpine α_1 -antitrypsine est potentiellement capable d'inhiber la caspase 3 (Petrache *et al.*, 2006). La serpine SCCA1 inhibe la papaïne de manière irréversible mais également réversible sans formation d'un complexe covalent (Masumoto *et al.*, 2003). L'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 3 ou PAI-3, aussi connu sous le nom d'inhibiteur du facteur C1 du complément (SERPING1), est capable d'inhiber de manière réversible le zymogène de l'urokinase, aussi connu sous le nom de scu-PA (« single chain urokinase »), (Schwartz et España, 1999). L'étude de Shieh *et al.* (1989) a montré que l' α_2 -antiplasminine (SERPINF1) est capable de former un complexe irréversible avec la trypsine et uniquement un complexe réversible avec l'antichymotrypsine. De plus, lors de la dissociation de ce complexe non covalent, la serpine libérée conserve son activité inhibitrice, suggérant qu'elle n'a pas été clivée. Lors de la formation d'un complexe Michaelien réversible, des interactions supplémentaires permettraient de le stabiliser empêchant soit le clivage de la liaison peptidique, soit l'insertion du RCL ou bien encore la formation de l'intermédiaire acylenzyme.

Il existe cependant d'autres mécanismes. Chez le moustique responsable de la fièvre jaune, *Aedes aegypti*, le produit du gène *AFXa* (« Anticoagulant Factor Xa ») inhibe le facteur Xa de la coagulation sanguine. Cette inhibition réversible, étroite et non covalente est cependant non compétitive. L'inhibiteur se fixerait sur un exosite du facteur Xa et non sur son site actif (Stark et James, 1998). L'inhibiteur de protéinase 9 (PI9), une serpine placentaire,

est capable, *in vitro*, d'inhiber la caspase 1, et lors de la dissociation du complexe, l'enzyme resterait active tandis que l'inhibiteur serait clivé et donc inactivé (Annand *et al.*, 1999).

VII.8 Maladies associées aux serpins

Le mécanisme d'action des serpins implique un basculement du RCL qui rend les serpins sensibles à des transitions conformationnelles aberrantes qui peuvent résulter de mutations ponctuelles. Il existe dans la littérature, un certain nombre de serpins décrites pouvant être affectées par ces mutations. Elles peuvent ainsi conduire à diverses pathologies telles que la cirrhose, la démence ou bien l'emphysème. De telles maladies ont été regroupées sous la terminologie de « serpinopathies ».

- l' α_1 -antitrypsine est un inhibiteur de protéase à sérine de 394 acides aminés synthétisé principalement dans le foie et, dans une moindre quantité, dans les monocytes sanguins, les macrophages alvéolaires et les cellules épithéliales des muqueuses bronchique et gastro-intestinale. Dans le plasma, c'est un inhibiteur de l'élastase des neutrophiles pulmonaires et sa concentration varie de 1,5 à 3,5 g/L. Plus de 100 variants ont été décrits pour le gène de l' α_1 -antitrypsine *SERPINA1* localisé sur le chromosome humain 14q31-31.2. La plus sévère déficience retrouvée en Europe est l'allèle Z, dans lequel le glutamate en position 342 est remplacé par une lysine. Près de 4% de la population est hétérozygote et 0,6% est homozygote. La mutation Z conduit à la rétention dans les hépatocytes d'environ 90% des serpins synthétisées. Cette accumulation débute *in utero* et conduit, chez le jeune enfant, à un ictère cholestatique qui, dans environ 15% des cas, évolue en cirrhose lors de l'adolescence. Du fait de l'accumulation de ces mutants dans les hépatocytes, l' α_1 -antitrypsine n'est plus présente dans le plasma. Les poumons sont donc exposés à la protéolyse pouvant conduire au développement d'un emphysème. Chez l'adulte, l'emphysème s'accompagne, dans 1 à 2% des cas, d'une broncho-pneumopathie chronique obstructive, une maladie chronique systématique respiratoire touchant les bronches. La mutation Z se situe entre la tête du brin 5 du feuillet βA et la base du RCL et permet d'ouvrir le feuillet βA . Une partie du RCL s'insère dans le feuillet β conduisant à la formation d'un intermédiaire instable. Cette partie de RCL peut s'insérer dans le feuillet ouvert et accessible d'une autre serpine, délogeant son propre fragment de RCL. Ce dernier, nouvellement libéré, peut à son tour s'insérer dans une autre serpine et ainsi de suite. Ce mécanisme génère au final des polymères qui s'accumulent sous forme d'inclusions dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes. En Sardaigne, la mutation la plus retrouvée est la mutation Mmalton dans laquelle la

phénylalanine 52 est déléetée. Au Japon, il s'agit de la mutation Siiyama (Ser53Phe). Ces deux mutations favorisent la polymérisation et provoquent les mêmes signes cliniques. Deux autres mutations S (Glu264Val) et I (Arg39Cys) ont également été décrites. Les taux de polymérisation et de rétention hépatique sont cependant plus faibles (tableau X). D'autres serpines mutées retrouvées accumulées dans les hépatocytes sont responsables de cirrhose (Gooptu et Lomas, 2009 ; Belorgey *et al.*, 2007 ; Ekeowa *et al.*, 2009 ; Janciauskiene, 2001 ; Lomas *et al.*, 2005 ; Carrell et Lomas, 2002 ; Mulgrew *et al.*, 2007).

Tableau X : Taux de polymérisation, degrés de polymérisation et taux plasmatique des mutants de l' α_1 -antitrypsine (adapté de Lomas *et al.*, 2005).

	Mutation	Degré de polymérisation	Taux plasmatique
Z	Glu342Lys	+++	+
Siiyama	Ser53Phe	+++	+
Mmalton	Δ Phe52	+++	+
S	Glu264Val	+	+++
I	Arg39Cys	+	+++

- la neuroserpine est une serpine sécrétée par les cônes axoniques en croissance du système nerveux adulte. Des inclusions de protéines appelées corps de Collins présentes dans les neurones caractérisent la maladie autosomale appelée FENIB (« Familial Encephalopathy with Neuroserpin Inclusion Bodies »). Six familles avec 5 mutations différentes de la neuroserpine ont été répertoriées (tableau XI). Ces 5 mutations provoquent différentes pathologies telles que la démence, les convulsions, les tremblements, les myoclonies ou encore la dysarthrie. La propension croissante à la polymérisation de la neuroserpine s'accompagne d'une augmentation du nombre de cellules contenant des inclusions polymériques et une diminution de la sécrétion de neuroserpine dans le milieu extracellulaire. L'accumulation de polymères est toxique pour les neurones. Les mutations les plus sévères impliquent la glycine en position 392, un résidu conservé du domaine « shutter ». La mutation, récemment identifiée, Gly392Arg provoque les symptômes les plus graves avec une démence sévère et d'importants troubles électriques lors du sommeil profond chez l'enfant

épileptique (Davies et Lomas, 2008 ; Belorgey *et al.*, 2007 ; Lomas *et al.*, 2005 ; Carrell et Lomas, 2002 ; Miranda et Lomas, 2006).

Tableau XI : Taux de polymérisation, nombre d'inclusions et gravité des signes cliniques de mutants de neuroserpine (adapté de Lomas *et al.*, 2005).

Mutation	Taux de polymérisation	Nombre d'inclusions	Age auquel la maladie se déclare	Signes cliniques
Ser49Pro	+	+	45-63	Démence et convulsion
Ser52Arg	++	++	20-40	Démence et myoclonie
His338Arg	+++	+++	15	Myoclonie progressive et épilepsie
Gly392Glu	++++	++++	13	Myoclonie progressive, épilepsie et chorée
Gly392Arg	++++	+++++	8	Démence sévère et état de mal épileptique

- L'antithrombine III ou ATIII est principalement synthétisée dans le foie puis libérée dans la circulation sanguine où sa concentration peut atteindre 150 µg/mL. Elle constitue le plus important inhibiteur physiologique de la coagulation sanguine. Elle est capable d'inhiber la thrombine (facteur IIa) et le facteur Xa (Quinsey *et al.*, 2004). Dans une moindre mesure, elle peut aussi inhiber les facteurs IXa, XIa, XIIa, l'activateur tissulaire du plasminogène, l'urokinase, la plasmine et la kallikréine. Elle existe sous deux formes, la forme α et la forme β , la première étant la forme majoritaire (Rau *et al.*, 2007). L'antithrombine circulante possède une faible capacité inhibitrice. Son effet est fortement augmenté (de plus d'un facteur 1000) en présence d'héparine. Les troubles liés à une déficience de l'antithrombine sont des maladies héréditaires autosomales et dominantes ; elles touchent une personne sur 500 à 1000. Une liste actualisée des différentes mutations existantes pour l'ATIII a été établie (<http://www1.imperial.ac.uk/medicine/about/divisions/is/haemo/coag/antithrombin/>). Dans la très grande majorité des cas, les personnes atteintes sont hétérozygotes. Les maladies héréditaires sont divisées en deux types, I et II. Le type I est lié à une diminution de la quantité de protéine. Les mutations causales nuisent à la synthèse et à la sécrétion de l'ATIII. Ces mutations sont majoritairement des délétions ou des insertions qui conduisent à l'apparition d'un codon stop prématuré. La substitution est rare et est une mutation non sens. Le second type est lié à un problème qualitatif. Il est sous-divisé en trois catégories (IIa à IIc)

suivant le défaut occasionné par la mutation. Les deux premiers touchent respectivement le site de fixation de la thrombine et le site de fixation de l'héparine tandis que le dernier présente un effet pléiotrope. Différentes mutations sont connues. Par exemple, dans le cas du type IIc, les mutations concernent notamment les résidus 402, 404 à 407 et 429 qui sont localisés dans le brin 1 du feuillet β C (s1C) constitué par la partie C-terminale du RCL (Patnaik et Moll, 2008). Certaines de ces mutations semblent prédisposer l'ATIII à se conformer sous forme latente, ce qui facilite sa dimérisation avec la forme native ATIII β . Cette dimérisation diminue le nombre de monomères actifs et accroît le risque de thrombogénicité (Rau *et al.*, 2007). Récemment, un cristal de dimère stable d'ATIII a été réalisé (Yamasaki *et al.* 2008). Dans cette étude, les auteurs proposent un nouveau modèle de dimérisation et polymérisation des serpinines (figure 23). La résolution du cristal a montré, qu'en plus du RCL, le brin s1C d'une molécule d'ATIII active se retrouve à l'extérieur. La formation d'un dimère s'opère, par un échange réciproque entre 2 molécules d'ATIII, de leurs segments correspondant au brin s5A et au RCL. Tout ceci se fait selon une conformation tête-à-queue et dos-à-dos et s'accompagne également d'un déplacement de l'hélice I et d'une déstructuration du brin s1C afin d'assurer une longueur suffisante pour l'insertion des deux segments. Cependant, cette structure ne s'applique qu'à l'ATIII et n'explique pas le phénomène de polymérisation rencontré pour d'autres serpinines.

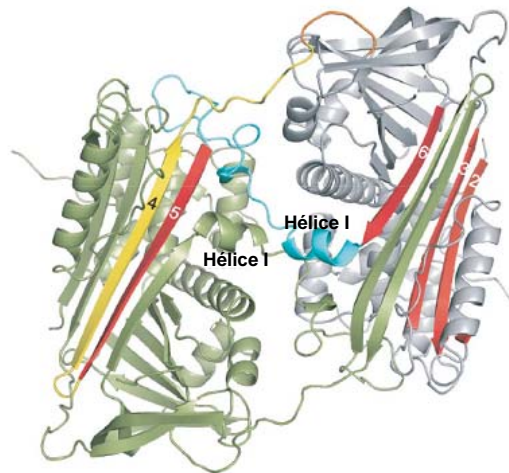


Figure 23 : Modélisation de la structure dimérique de l'antithrombine III (ATIII). La dimérisation résulte de l'échange des brins s5A (rouge) et RCL (jaune) de deux serpinines. Elle s'accompagne d'une distorsion du brin s1C (orange) et le déplacement de l'hélice hI (adapté de Yamasaki *et al.*, 2008).

Enfin, l'équipe de Yamasaki *et al.* (2008) a proposé un modèle expliquant le phénomène de polymérisation rencontré notamment lorsque l' α 1-antitrypsine est mutée (figure 24).

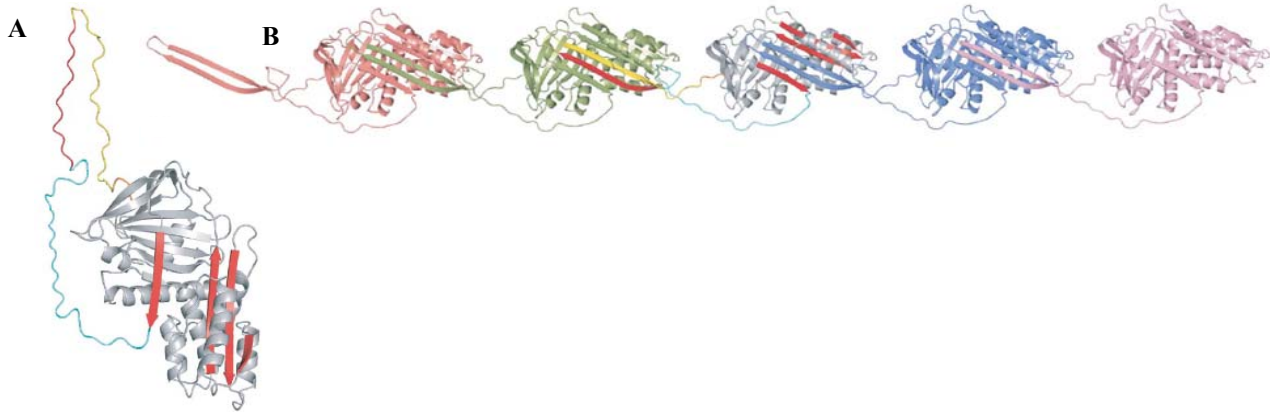


Figure 24 : Modèle d'un intermédiaire M^* et d'un polymère de serpentine. **A**, modèle d'un monomère intermédiaire M^* avec les différentes structures impliquées dans la polymérisation débobinée : l'hélice I (en bleu), le brin $s4A$ (en rouge), le RCL (futur brin $s4A$ en jaune) et le brin $s1C$ (en orange). **B**, Modèle pentamérique formé par l'assemblage d'unités monomériques M^* (adapté de Yamasaki *et al.*, 2008).

Il repose en partie sur le mécanisme de dimérisation de l'antithrombine III. Le RCL et le brin $s5A$ d'une serpentine s'insèrent dans une autre serpentine. Les deux segments de cette dernière ne vont pas, en retour, se loger dans la première serpentine mais dans une troisième, déclenchant alors le phénomène de polymérisation. De plus, dans le cas de la polymérisation, l'hélice I est totalement débobinée pour permettre l'insertion dans une autre anti-protéase. Selon Whisstock et Bottomley (2008), le processus de polymérisation, *in vitro*, se déroulerait en deux étapes. La première étape permettrait la formation de monomères M^* , qui dans une seconde étape plus lente d'association intermoléculaire et dépendante de la concentration, seraient capables de s'associer pour former des polymères. Le monomère M^* serait donc l'intermédiaire qui conduirait soit au repliement normal de la protéine sous forme native, soit, en cas de mutations empêchant un repliement correct, à la polymérisation. Dans ce modèle, les brins $s1C$, $s5A$ et le RCL sont les derniers éléments de la serpentine à se mettre en place.

VII.9 Implication des serpins musculaires dans la tendreté de la viande

Dans le tissu musculaire, différentes serpins ont été identifiées. Parmi elles, un certain nombre a été localisé au niveau de la jonction neuro-musculaire. C'est le cas de la Protéase Nexin-1, un inhibiteur de la thrombine synthétisé uniquement après la fusion des myoblastes en myotubes (Verdière-Sahuqué *et al.*, 1996 ; Akaaboune *et al.*, 1998), l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI), la kallistatine qui se lie à la kallikréine, l' α_1 -antichymotrypsine, la kunine et la Protease Nexin II, connue sous le nom de précurseur de la protéine β -amyloïde. Chez le nématode *C. elegans*, la serpine SRP-3 inhibe des protéases à sérine de type chymotrypsine (Pak *et al.*, 2006). Un inhibiteur de protéase I a été retrouvé dans le muscle de 6 espèces piscicoles phylogénétiquement différentes (Pérez-Borla *et al.*, 1998).

A ce jour, peu d'études ont été menées sur les relations existantes entre les inhibiteurs de protéases à sérine et le phénomène de tendreté de la viande. Signalons cependant l'étude de Zamora *et al.* (1996) qui montre l'existence d'une corrélation négative entre l'activité des inhibiteurs de protéases à cystéine et à sérine et la tendreté de la viande dans les muscles *longissimus lumborum* et *thoracis*. De plus, parmi les 29 variables testées telles que le pH, la longueur du sarcomère ou l'osmolarité, le taux d'inhibiteurs de protéases à sérine constitue le meilleur facteur de prédiction de la dureté de la viande (Zamora *et al.*, 2005). Ainsi, à 6 jours *post-mortem*, 70% de la variabilité de la dureté de la viande peuvent être expliqués par seulement 6 variables biologiques dont la concentration en protéases à sérine mesurée à la mort de l'animal, et qui représente le facteur le plus significatif.

Chez le bovin, deux serpins de la famille de l' α_1 -antichymotrypsine (SERPINA3) ont été extraites du muscle squelettique bovin et caractérisées biochimiquement (Tassy *et al.*, 2005 ; Brémaud *et al.*, 2006). Ces deux serpins initialement nommées mEndopine 1A et 1B sont aujourd'hui répertoriées dans les banques de données sous le nom de bovSERPINA3-1 et bovSERPINA3-3, respectivement. L'origine du terme Endopine vient de la découverte initiale de ces serpins dans les cellules chromaffines endocrines (Hwang *et al.*, 1999).

RESULTATS - DISCUSSION

Partie I

Clonage et séquençage du gène et de l'ADNc codant bovSERPINA3-3

Au début de ma thèse, l'identification des gènes codant les deux protéines inhibitrices de protéases à sérine bovSERPINA3-1 et bovSERPINA3-3, purifiées à partir du muscle squelettique bovin et préalablement appelées mEndopine 1A et 1B, avait déjà été initiée. Notre équipe avait également pu mettre en évidence l'existence, dans le génome bovin, d'une famille multi-génétique *SERPINA3* constituée de plusieurs membres. Ces deux inhibiteurs appartiennent à la famille de l' α -1-antichymotrypsine (Serpine A3) et partagent près de 67% d'identité avec la protéine serpine A3 humaine, codée par le gène *SERPINA3*. Dans des espèces telles que la souris ou le porc, des gènes homologues à celui du gène *SERPINA3* se trouvent être regroupés dans des clusters. L'amplification par PCR sur des BACS et le sous-clonage moléculaire ont permis d'obtenir différents clones dont le séquençage était en cours. Ainsi, il m'a été confié le séquençage de la totalité du gène et du cDNA codant l'anti-protéase bovSERPINA3-3. Les résultats concernant l'ensemble des gènes de cette famille de serpines A3 bovines et leur localisation chromosomique a donné lieu à publication (Pélissier *et al.*, 2008).

**An original SERPINA3 gene cluster: elucidation of genomic organization
and gene expression in the Bos taurus 21q24 region**

Pelissier P., Delourme D., Germot A., **Blanchet X.**, Becila S., Maftah A., Leveziel H.,
Ouali A. & Bremaud L.

BMC Genomics, 2008, 9:151

M	R	A	E	R	L	S	P	L	L	A	L	G	L	L	V	A	G	I	R	S	V	H	23
ATG	AGG	GCA	GAG	AGA	CTG	TCC	CCC	CTC	CTG	GCT	CTG	GGG	CTC	CTG	GTG	GCT	GGG	ATC	CGC	AGT	GTC	CAC	69
C	L	P	E	N	V	V	V	K	D	R	H	R	R	V	D	G	H	T	L	A	S	S	46
TGC	CTC	CCA	GAG	AAT	GTG	GTG	GTG	AAG	GAC	CGG	CAC	AGA	AGG	GTG	GAT	GGC	CAC	ACG	TTA	GCC	TCC	AGC	138
N	T	D	F	A	F	S	L	Y	K	Q	L	A	L	K	N	P	N	K	N	V	M	F	69
ACC	GAC	TTC	GCC	TTC	AGC	CTC	TAC	AAG	CAG	TTG	GCT	TTG	AAG	AAC	CCC	AAT	AAG	AAT	GTC	ATG	TTC	TCC	207
S	P	L	S	V	S	M	A	L	A	F	L	S	L	G	A	R	B	P	T	L	T	E	92
AAC	CCG	CTG	AGT	GTC	TCC	ATG	GCC	TTG	GCC	TTC	CTG	TCT	CTG	GGG	GCC	CGT	GGC	CCC	ACC	CTG	ACA	GAG	276
I	L	E	G	L	K	F	N	L	T	E	I	Q	E	T	Q	I	H	Q	G	F	Q	H	115
ATC	CTG	GAA	GGC	CTC	AAG	TTC	AAC	CTC	ACG	GAG	ATC	CAG	GAG	ACA	CAG	ATC	CAC	CAG	GGC	TTC	CAG	CAC	345
L	L	Q	A	L	N	R	P	R	N	Q	L	Q	L	S	V	G	N	A	M	F	V	Q	138
CTC	CTG	CAG	GCG	CTC	AAT	CGA	CCC	AGG	AAC	CAG	CTG	CAG	CTG	AGC	GTG	GGC	AAC	GCC	ATG	TTT	GTG	CAG	414
E	E	L	K	L	L	D	K	F	I	E	D	A	R	V	L	Y	S	S	E	A	F	P	161
GAG	GAG	GCC	TTC	CCG	ACC	GAG	CTG	AAG	CTG	CTG	GAC	AAG	TTC	ATA	GAA	GAT	GCC	CGT	GTG	CTG	TAC	TCC	483
T	N	F	R	D	P	E	A	A	K	S	L	I	N	D	Y	V	K	N	K	T	Q	G	184
TCC	AAC	TTC	AGG	GAT	CCT	GAA	GCT	GCC	AAG	AGT	CTA	ATA	AAT	GAC	TAT	GTG	AAG	AAT	AAA	ACC	CAG	GGG	552
K	I	E	E	L	F	K	D	L	S	P	R	T	E	L	V	L	V	N	Y	V	Y	F	207
AAA	ATT	GAG	GAG	CTG	TTC	AAG	GAC	CTT	TCC	CCA	AGA	ACG	GAG	TTG	GTC	CTG	GTG	AAT	TAC	GTC	TAC	TTT	621
K	A	Q	W	K	T	R	F	D	P	K	H	T	E	Q	A	E	F	H	V	S	D	N	230
AAA	GCC	CAA	TGG	AAG	ACC	CGC	TTT	GAC	CCC	AAA	CAC	ACT	GAG	CAG	GCA	GAG	TTC	CAC	GTG	AGC	GAC	AAC	690
K	T	V	E	V	P	M	M	T	L	D	L	E	T	P	Y	F	R	D	E	E	L	G	253
AAG	ACG	GTG	GAG	GTG	CCC	ATG	ATG	ACC	CTT	GAC	CTG	GAA	ACC	CCT	TAC	TTC	CGG	GAC	GAG	GAG	CTG	GGC	759
C	T	L	V	E	L	T	Y	T	S	N	D	S	A	L	F	I	L	P	D	K	G	K	276
TGC	ACG	CTG	GTG	GAG	CTC	ACG	TAC	ACC	AGC	AAC	GAC	AGC	GCC	CTC	TTC	ATC	CTC	CCC	GAC	AAG	GGC	AAA	828
M	Q	D	L	E	A	K	L	T	P	E	M	L	T	R	W	R	N	S	L	Q	P	R	299
ATG	CAG	GAC	CTG	GAA	GCC	AAG	CTG	ACC	CCG	GAG	ATG	CTG	ACG	AGG	TGG	GCA	AAC	TCC	CTG	CAG	CCC	AGA	897
R	I	H	E	L	Y	L	P	K	F	S	I	K	S	N	Y	E	L	N	D	T	L	S	322
CGA	CAT	GAA	CTC	TAC	CTG	CCA	AAA	TTT	TCC	ATC	ATA	AAA	AGC	AAC	TAT	GAA	CTG	AAT	GAC	ACC	CTC	TCC	966
Q	M	G	I	K	K	I	F	T	D	A	D	L	S	G	I	T	G	T	A	D	L	V	345
CAG	ATG	GGC	ATT	AAG	AAA	ATA	TTC	ACC	GAC	GCT	GAC	CTG	TCA	GGA	ATC	ACA	GGG	ACC	GCG	GAC	CTG	GTA	1035
V	S	Q	V	V	H	G	A	A	L	D	V	D	E	E	G	T	E	G	A	A	A	T	368
GTC	TCC	CAG	GTG	GTC	CAC	GGC	GCT	GCG	CTG	GAC	GTG	GAT	GAG	GAG	GGC	ACG	GAA	GGT	GCT	GCT	GCC	ACG	1104
G	I	G	I	E	R	T	F	L	R	I	I	V	R	V	N	R	P	F	L	I	A	V	391
GGA	ATC	GGC	ATA	GAA	AGA	ACG	TTC	TTG	AGA	ATC	ATT	GTG	CGT	GTC	AAC	AGG	CCC	TTC	CTG	ATT	GCC	GTA	1173
V	L	K	D	T	Q	S	I	I	F	L	G	K	V	T	N	P	S	E	A	*		411	
GTT	CTC	AAA	GAC	ACC	CAG	AGC	ATC	ATC	TTT	TTG	GGG	AAA	GTC	ACC	AAC	CCC	AGT	GAA	GCC	TAG			1230

Figure 25 : Séquences nucléotidique et protéique déduite du gène *bovSERPINA3-3*. La protéine *bovSERPINA3-3* de 411 acides aminés (en bleu) possède, du côté N-terminal, un peptide signal (surligné en gris) qui est clivé lors de la maturation pour donner une protéine mature de 386 résidus. Les 5 sites potentiels de N-glycosylation (N-X-S/T) sont symbolisés par des têtes de flèche.

I.1 La famille multi-génique *bovSERPINA3*

Après criblage de la banque de BACs construite par l'équipe du Dr A. Eggen (INRA, Jouy en Josas), l'amplification de plusieurs fragments de PCR de 7 à 8 kbp, leur clonage moléculaire et leur séquençage, le « cluster » contenant les membres de cette famille multi-génique *bovSERPINA3* a été organisé et localisé sur le chromosome BTA 21, en position q24 où il est réparti sur environ 200 kpb. Il est constitué 8 gènes et un pseudo-gène. Cette situation originale n'est encore retrouvée dans aucune autre espèce. Chez l'Homme, il existe un seul orthologue appelé gène *SERPINA3*. L'identification de l'ensemble de ces gènes a abouti à une redéfinition de leur nomenclature. Désormais, les gènes de ce « cluster » seront dénommés *bovSERPINA3-x* et les protéines correspondantes *bovSERPINA3-x*, x correspondant au numéro du membre. Ainsi, le gène préalablement appelé mEndopine 1B a été renommé *bovSERPINA3-3*.

Ces différents gènes présentent tous une même organisation. Ils sont composés de 5 exons et 4 introns, le premier exon étant non codant. De plus, la taille de leurs introns et exons est voisine, à l'exception de l'intron 2 de *bovSERPINA3-1* et *A3-2* qui possède, en plus, un élément transposable de type LINE. Cette organisation en 5 exons et 4 introns permet de répertorier ces gènes dans la classe II des serpinés selon la classification de Ragg *et al.* (2001). Ces 8 gènes possèdent également une très forte homologie de séquence (plus de 90%).

I.2 Le gène *bovSERPINA3-3* et son ADN complémentaire

Le gène *bovSERPINA3-3* a une taille de 7387 pb (figure 26). L'ARNm correspondant a une longueur de 1509 bases. Le cadre de lecture ouvert code la protéine *bovSERPINA3-3* (figure 25). Elle est constituée de 411 acides aminés dont les 23 premiers correspondent à un peptide signal ; elle présente près de 92% d'identité avec la protéine *bovSERPINA3-1*. *BovSERPINA3-3* possède 5 sites potentiels de *N*-glycosylation, contrairement à *bovSERPINA3-1* qui n'en compte que 4. Ceci peut expliquer en partie la différence de taille observée entre ces 2 protéines après migration en SDS/PAGE (Brémaud *et al.*, 2006).

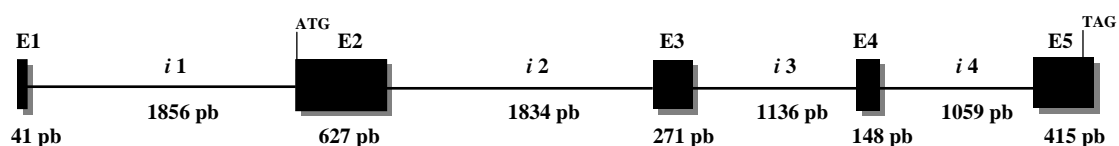
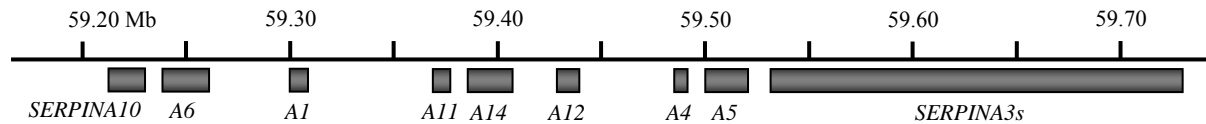


Figure 26 : Organisation structurale du gène *bovSERPINA3-3*. Ce gène est constitué de cinq exons (E1-E5) et quatre introns (i1-i4) dont les tailles respectives sont indiquées. Le codon de démarrage de la traduction est situé au début de l'exon 2 et le codon de terminaison est localisé, quant à lui, à la fin du dernier exon.

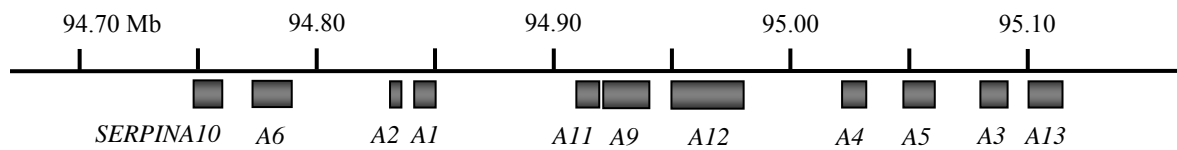
A

BTA 21



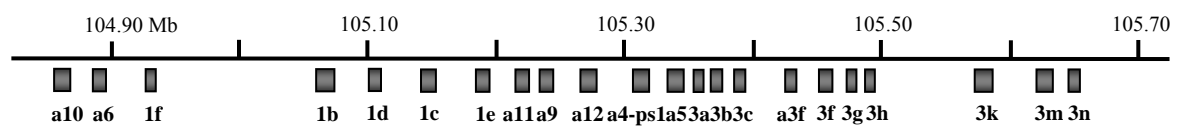
B

HSA 14



C

MMU 12



D

SSC7

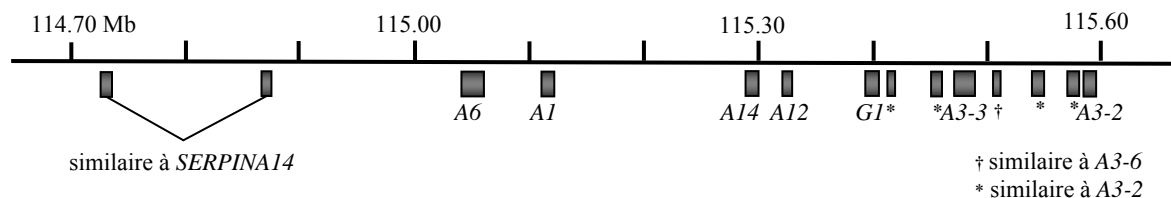


Figure 27 : Organisation des gènes du clade A présents au voisinage du ou des gène(s) SERPINA3 chez le bovin (A), l'Homme (B), la souris (C) et le porc (D). Chez le bovin, 8 gènes du clade A sont retrouvés en amont du « cluster » SERPINA3 sur environ 330 kpb. Chez l'Homme, le gène SERPINA3 est situé sur le chromosome 14. Neuf gènes, répartis sur environ 350 kpb, sont localisés en amont et un est situé en aval. Chez la souris, de nombreux gènes du clade A existent. Onze gènes et un pseudo-gène sont présents en amont du « cluster » SERPINA3 comprenant 9 gènes et un pseudo-gène. L'ensemble est réparti sur près de 600 kpb. Chez le porc, la situation n'est pas clairement établie. Différents gènes similaires au « cluster » des gènes SERPINA3 bovins sont retrouvés. Quatre gènes du clade A et un gène du clade G sont localisés en amont. Ces organisations se basent sur les données existantes dans la banque de données du NCBI.

I.3 Conclusion et résultats complémentaires

Il est intéressant de noter également qu'un grand nombre de gènes du clade A des serpins est présent dans la région 21q24 du génome bovin (figure 27A). Ainsi, en amont du « cluster » des gènes de la sous-famille SERPINA3, 8 gènes de serpins (bovSERPINA3-1, A3-2, A3-6, A3-3, A3-4, A3-7, A3-5 et A3-8) sont également présents, ainsi que le gène *SERPINA14* qui n'a été que très récemment identifié (Ulbrich *et al.*, 2009). Tous ces gènes présentent la même organisation structurale à savoir 5 exons et 4 introns permettant de les répertorier également dans classe II des serpins. De plus, l'alignement des séquences protéiques des serpins bovines du clade A établies à partir des séquences exoniques montre un découpage consensus au sein de ces différentes protéines (figure 28). Ceci suggère une origine commune à partir de laquelle ces gènes auraient évolué par une série de duplications comme l'ont montré Atchley *et al.* (2001) avec les gènes *SERPINA1*, *SERPINA3* et *SERPINA6*. Par ailleurs, un autre gène du clade A, le gène *SERPINA7*, dont le transcrit et la protéine ont été identifiés, n'est pas encore localisé.

Une analyse phylogénétique des différentes séquences protéiques codées par les gènes du clade A bovin a été réalisée (figure 29). Elle montre la grande cohésion évolutive des SERPINA3 bovines (valeur de bootstrap = 100%) qui dérivent d'un même gène ancestral et l'absence de résolution des relations de parentés entre les autres serpins du clade A. Toutefois, les SERPINA10 et SERPINA14 semblent divergentes par rapport aux autres serpins. Cela pourrait s'expliquer par des spécificités fonctionnelles voire des répartitions taxonomiques différentes. En effet, la protéine codée par le gène *SERPINA10* présente une fonction spécifique ; elle inhibe le facteur Xa de la coagulation en s'associant à la protéine Z qui est une protéine vitamine-K dépendante (Chandrasekaran *et al.*, 2009). Le gène *SERPINA14* code, quant à lui, une protéine spécifique des ruminants et des suidés. Elle interviendrait dans la tolérance immunologique maternelle envers l'embryon et serait impliquée dans l'inhibition fonctionnelle des lymphocytes *in vitro* (Padua *et al.*, 2009).

Chez l'Homme, le gène *SERPINA3* est unique et est localisé sur le chromosome 14 en aval des 9 gènes *SERPINA10*, A6, A2, A1, A11, A9, A12, A4, A5 et en amont du gène *SERPINA13* (figure 27B). Chez la souris (figure 27C), un « cluster » du gène *SERPINA3* a également été décrit. Il est constitué de 9 gènes et un pseudo-gène et est localisé sur le chromosome 12. Cependant, et contrairement à la situation chez le bovin, les protéines de ce « cluster » présentent une plus faible identité de séquence entre elles (voisin de 60%). Enfin, chez le porc (figure 27D), la situation est moins précise. Plusieurs gènes ou assimilés aux gènes

Séquences codées par l'exon 2

bovSERPINA12	-----MNPFLGLGLLLAGLLTVEGLLKSFNFSPENHEAVSQGQVEKKGKTAQELAKRNDADFGLKFKKLSFSSPDNNILFSPWSISMAFMSLSLGAQDSTLAEIKEG--FNFNRNI	107
bovSERPINA3-3	-----MRAERLSPDLLALGLLVAGIRS-VHCLPENVVVKDRHRR--VDGHTLASSNTDFAFSLYKQLALKNPKNVMSPLSVSMALAFSLGARGPTLTEILEGLKFNLTETI	104
bovSERPINA3-4	-----MRAERLSPDLLALGLLVAGIRS-VHCLPENVVVKDRHRR--VDGHTLASSNTDFAFSLYKQLALKDPKNVMSPLSVSMALAFSLGARGPTLTEILEGLKFNPTETI	104
bovSERPINA3-5	-----MRAERTSFLLAGLLMAGIRS-VHCLPENVVVKDQRR--VDSHTLASSNTDFAFSLYKQLALKNPKNVMSPLSVSMALAFSLGARGPTLTEILEGLKFNLTETI	104
bovSERPINA3-1	-----MRAERTSFLLAGLLVAGIRS-VHCLPENVVVKDQRR--VDGHTLASSNTDFAFSLYKQLALKNPKNVILSPLSVSIALAFSLGARGSTLTEILEGLKFNLTETI	104
bovSERPINA3-2	-----MRAERTSFLLAGLLVAGIRS-VHCLPENVVVKDQRR--VDGHTLASSNTDFAFSLYKQLALKNPKNVILSPLSVSIALAFSLGARGSTLTEILEGLKFNLTETI	104
bovSERPINA3-6	-----MRTERVSPLLALGILVAGLCSRHVCLPENVTPEEQHKVTSVDGHSGLASSNTDFAFSLYKQLALKDPKNVIFSPLSVSIALAFSLGAHGPTVTEILEGLKFNLTET	107
bovSERPINA3-8	-----MRAERMSPDLLALGLLVSGLCSRHVCLPENVAPEERHKGTSVDGHSGLASSNTDFAFSLYKQLALKNPKNVIFSPLSISIALAFSLGARGPTVTEILEGLKFNLTET	107
bovSERPINA3-7	-----MRTERTSFLLAGLLVSGFCRSRVHCLPENVTPEEQHKGTSVDGHSGLASSNTDFAFSLYKQLALKDPKNVIFSPLSISIALAFSLGAHGHTVTEILEGLKFNLTET	107
bovSERPINA11	-----MGPAWLWLLGAGILASVHCQPLPAHGDKSLRVEAPRQGLS-ESLPAYQKIPTPLTSFALRLYKQLAAETPG-NIFFSPVLSSTLALLSLGVQANTRTQILEGLGFNLTET	110
bovSERPINA7	-----MPLFSVLVLLILGLHCAPPNSCEGKITSCLSPQONATLYKMSSINADFANLYRRFTVEIPDQNIFFSPVSIAGLAMLSLGCASSTQTQILEGLGFNLTDT	101
bovSERPINA4	-----MHLAGFLLLLLAGRLVLSQGLHPKHGQGHHLPRQAPGTGEGFSSLKINPGNTTFFALHFFHLLASQAPGG-SIFSPLSIST-LAMLSLEVLSHSRTQILEGLGFNLTQV	109
bovSERPINA5	-----MRLCLFCLVLLGPRMATLRRSQK-KKIQEVPPAVTTPAGSRDFVFDLYRALAAAAPQNIFFSPLSITVSLAMLSLGAQSNKKAQILEGLGIGPGE	98
bovSERPINA1	-----MALSI TRGLLLLAALCCLAPISLAGVLQGHAVQETDDTSHQEAAACHKIAPNLANFAFSIYHHLAQSNSTNIFSPVSIASAFAMLSLGAKNHTHTTEILKGLGFNLTET	109
bovSERPINA6	-----MLPTLYTCLLWLSTSGLWTVQAKGSDTDMSTRNPHRDLPANNVDAFTLYKHLVASAPKNVIFSPVSI STALAMLSLGAQYTRQLLQGLGFNLTET	99
bovSERPINA10	MWAVLSLPLACLLAQAWLVPGSTLASHSPAQAGLETLLTPMAQNKTSQTSERQWAPEEEEEREEDSPWLLAEGQQLSREASNDFALRKLKISLKHGDG-NVVFSPGLAWAMAALLTLGARGHSRAQLEDLLQAWNQT	138
bovSERPINA14	-----MSHGRMNLLALSVPFLCGLFNISICEKQQHSQKHMNLVLLKKISALSQKMEAHPKDFAQELFKALIIEDPRKNIIFSPMAMTTTLATLSLGIKSTMRTHHPEDLKLPEKLL	111

Séquences codées par l'exon 2

bovSERPINA12	PEKDLHEAFHYLIHRLNQRNQ-----DQRLGLGNALFIDQVKPKQKFLTEVRNMYKADTIPTNFRNSENAAKQKINNVYSQKTQKGINNVLKNI DPVTMLLINYIFFRARWQHEFDPKETKEED-FILDRNKTVKV	238
bovSERPINA3-3	QETQIHQGFQHLLQALNRPNRN-----QLQLSVGNAMFVQEELKLLDKFIEDARVLYSSEAFPTNFRDPEAAKSLINDYVKNKTQGIIEELFKDLSRPTTELVLVNYVYFKAQWKTRFDPKHTEQAE-FHVDNKTVEV	235
bovSERPINA3-4	QETQIHQGFQHLLQALNRPNRN-----QLQLSVGNAMFVQEELKLLDKFIEDARVLYSSEAFPTNFRDPEAAKSLINDYVKNKTQGIIEELFKDLSRPTTELVLVNYVYFKAQWKTRFDPKHTEQAE-FHVDNKTVEV	235
bovSERPINA3-5	QETQIHQGFQHLLQALNRPNSN-----QLQLSVGNAMFVQEELKLLDKFIEDARVLYSSEAFPTNFRDSEAAKSLINDYVKNKTQGIIEELFKYLSRPTVLVNLVNYIYFKAQWKTRFDPKHTEQAE-FHVSKNKTVEV	235
bovSERPINA3-1	QEKEIHHSFQHLLQALNQPSN-----QLQLSVGNAMFVQEELKLLDKFIEDAQVLYSSEAFPTNFRDSEAAKSLINDYVKNKTQGIIEELFKYLSRPTTELVLVNYIYFKAQWKTPFDPKHTEQAE-FHVDNKTVEV	235
bovSERPINA3-2	QEKEIHHSFQHLLQALNQPSN-----QLQLSVGNAMFVQEELKLLDKFIEDAQVLYSSEAFPTNFRDSEAAKSLINDYVKNKTQGIIEELFKYLSRPTTELVLVNYIYFKAQWKTPFDPKHTEQAE-FHVDNKTVEV	235
bovSERPINA3-6	PETEIHQGFQHLLQTFNQPSN-----QLQLSVGNAIFVQEELKLLDKFIEDARVLYSSEAFPTNFRDPEAAKSLINDYVKNKTQGIIEELFKDLSRPTTELVLVNYVYFKAQWKTRFDPKHTEKTE-FHVDNKTVEV	238
bovSERPINA3-8	PEREIHQGFQHLLQMLSRPSN-----ELQLSVGNMTMFVQEQLKLLDKFREDALALYTSSEAFSTNFKDPETAKSLINDYVKNKTGRKIVDLFKDLDPLTKVILVNYIYFKAQWRTPFDPKQTYKSO-FHVSKNKTVEV	238
bovSERPINA3-7	PETEIHQGFQHLLQTFNQPSN-----QLQLSVGNAMFVSEELKLLDKFRKDAEAFYASEVLSSTNFKDSEADVKLINERYVKNKTGKIEKLFNDLDVLTNLILLNYIFFKAQWKTPFNPNHYTESE-FHVSQNERVIV	238
bovSERPINA11	PEADIHRGFQSLIHTLDDLPSP-----KLELKLGNLSFLDTQLKPKQHLLDNI RELYGVFAFSANFTNSDATRKQINGVYSRQTYGVQVVDCEEFTPDPTLMVLLNYMFFKAKWKHPFNRYQTQKQESFFVDGRTSLRI	241
bovSERPINA7	PVAEIQQGFQHLICSLNFPKK-----ELELQMGNALFIGKQLKPLEKFLDDVKNLYETEVEFSTDFSNVSAQQEINSHVEKQTKGKIVGLIQDLKPNITIVLVNLYCFKAQWANPFDPKTEEGSSFLVDKTTTVQV	232
bovSERPINA4	SEFDSHQGFQNLHLYLPGN-----RLEVCMGNVFLSPEQLLLRILKDSASFCE SRLFCPTNFKDSVSMTQLINHHLRGN-LGKIVNLSKLNADTMMLVNYVYFKAQWKTRFDPKHTEQAE-FYVDEDTTVKV	240
bovSERPINA5	SEEEHLSASQRLRLRELQPPD-----SLQLSLGNALFTKPRLP IQEAF LGAMRTLYLADTFPTNFDEPEGAKKINDYVAKQTKGKIVDLIKSLDGTQVMVMVNYIFFKAKWETSFNLKSTHEQD-FYVTPETVVRV	229
bovSERPINA1	AEAEIHKGFFQHLHLLNQPNH-----QLQLTTGNGLFINESAKLVDTFLEDVKNLYHSEAFSINFRDAEEAKKINDYVEKGSHGKIVELVKVLDPNTPVFLVNYISFKGKWEKPFEMKHTTERD-FHVDEQTTVKV	240
bovSERPINA6	SEGEIHRAFRLHLLHLLRESNT-----TLDMTMGNALFLDHSLELLESFADTKHYHELEALTTFDQWAGASQKINEYIKNKTQKINVDLSESDSSATLILVNYIFFKGMWAHSFDLESTREEN-FHVNEATTVOV	230
bovSERPINA10	WVFNQTRPRLPALFKQLQESLSHNPELGLAQGSFAFIHKDFDIRETFHNTSKRYFDMCECVTVDFHNTSQAKRLINHYMNGTQKGLKFLDEINPDKLLLDVYIILFKGKWLIPFDPALFEMDT-FYLDKYKVKV	269
bovSERPINA14	DVHKYLQPLVHVHRELVKQKV-----LKHQHILFINRKMVMNQMLLQOIKSLQGMIDIMIDFTDIEKAKKTI SHHVAEKHTHTKITNLITDLNPEITILCVNHIFFKGILKRAFQPKLTQKEV-FFVNDQTKVQV	242

Figure 28 : Alignement des séquences protéiques des serpins bovines du clade A établies à partir des séquences exoniques. Les séquences protéiques ont été alignées à l'aide du logiciel Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). La recherche du découpage exon-intron a été réalisée en utilisant le logiciel en ligne Spidey (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/index.html>) qui permet d'aligner les cadres de lecture ouverts des différentes serpins sur leurs séquences génomiques respectives. Il est à noter que l'exon 1 de chaque gène étant non codant, la numérotation commence à partir de l'exon 2.

Séquences codées par l'exon 3

Séquences codées par l'exon 4

bovSERPINA12	PMMFH-VGMYKVGHDDQLSCTTILEIPYQSNFTAIFVLPPE-EGRMKQVEQALGPDTFARWKKLLVRR	---VADVFPRLTITSSSYDLKMLSHLGISKIFEE-HGDLTRISPHRNLKVD	AVHKATLKMDEKGTGAAAG	370
bovSERPINA3-3	PMMTL-DLETPYFRDEELGCTLVLETYTSNDSALFILPD-KGKMQDLEAKLTPEMLTRWRNSLQPR	---RIHELKPKFSIKSNYELNDTLSQMGIKKIFT--DADLSGITGTADLVVSQ	VVHGAALDVDEEGTEGAAA	367
bovSERPINA3-4	PMMTL-DLETPYFRDEELGCTLVLETYTSNDSALFILPD-KGKMQDLEAKLTPEMLTRWRNSLQPR	---RIHELKPKFSIKSNYELNDTLSQMGIKKIFT--DADLSGITGTADLVVSQ	VVHGAALDVDEEGTEGAAA	367
bovSERPINA3-5	PMMTL-DLETPYFRDEELGCTLVLETYTSNDSALFILPD-KGKMQDLEAKLTPEMLTRWRNSLQPR	---RIHELKPKFSIKSNYELNDTLSQMGIKKIFT--DADLSGITGTADLVVSQ	VVHGAALDVDEEGTEGAAA	367
bovSERPINA3-1	PMMTL-DLETPYFRDEELGCTLVLETYTSNDSALFILPD-KGKMRDLEAKLTPEMLTRWRNSLQPR	---RIHELKPKFSIKSNYELNDILSQLGIRKIFA--NADLSGITGTADLVVSQ	VVHGAALDVDEEGTEGAAA	367
bovSERPINA3-2	PMMTL-DLETPYFRDEELGCTLVLETYTSNDSALFILPD-KGKMRDLEAKLTPEMLTRWRNSLQPR	---RIHELKPKFSIKSNYELNDILSQLGIRKIFA--NADLSGITGTADLVVSQ	VVHGAALDVDEEGTEGAAA	367
bovSERPINA3-6	PMMTL-DLETPYFRDEELGCTLVLETYTSNDSALFILPD-KGKMQDLEAKLTPEMLTRWRNSLQPR	---RIHELKPKFSIKSNYELNDTLSQMGIKKIFT--DADLSGITGTADLVVSQ	VVHGAALDVDEEGTEGAAA	370
bovSERPINA3-8	PMMISIGDLVTPYFRDEELGCTLVLETYTSNDSALFILPD-KGKMQDLEAKLTPEMLTRWRNSLQPR	---GIHELNLPRFSIATDYKLDILSQLEIKKVFQ--EADLSGITDDHELEVSQ	VVHKAALDVDEEGTEGAAA	372
bovSERPINA3-7	PMMTL-YLETPYFRDEELGCTLVLETYTSNDSALFILPD-KGKMQDLEAKLTPEMLTRWRNSLQPR	---LIHRLRLPRFSISSHYQLKDILSQLGIRKIFA--DADLSGITDDHKLAVSHV	IHKAVLDVDEEGTEGAAV	369
bovSERPINA11	PMMHQKEM-HRFLYDQEVACTVLQLEYSGNAQALLILPD-PGKMAQVEAALQPETLKKWDLKLLPS	---LDDLHLKPKFSISGTNYLEILPHIGLTLFNS-EADYSGITGQLNRTISR	VSHKATVDVSEERGTEAAVA	373
bovSERPINA7	PMMHQMEQ-YYHLVDTELNCTVLQMDYSKNALALFVLPK-EGQMEWVEGAMSSKTLKKWNRLLRKG	---WVDFVVPKFSISATYDLGDILKMGIQDAFAD-NADFSGLTKDNGLKVSN	VAHKAMFYIGEKGTEAVPE	364
bovSERPINA4	PMMFQDQHHWYPHNRYLPCVLWYMQCQNIITLFLILPN-EGKMQDLEAKLTPEMLTRWRNSLQPR	---LIHRLRLPRFSISSHYQLKDILSQLGIRKIFA--DADLSGITDDHKLAVSHV	IHKAVLDVDEEGTEGAAV	378
bovSERPINA5	PMMKQDQD-FYLLDRNLSCKVVGVVYQGNATAFFILPR-EGEMEQVENGLKEKTLKKWLRMPMKR	---RLELYLKPKFSIBGSYQLEEVLPKLGIRIDFITS-DADLTGINSHSSIRVSE	VMHKAALVDEEGTEGAAA	361
bovSERPINA1	PMMNRLGM-FDLHYCDKLASWVLLLDYVGNVTACFILPD-LGKQLQLEDKLNELLAKFLEKKYAS	---SANLHLPKLSISSETYDLKSVLGDVIGITEVFS-DADLSGITKEQPLKVKSA	LHKAALIDEKGTGAVGS	372
bovSERPINA6	PMMFQDQD-FYLLDRNLSCKVVGVVYQGNATAFFILPR-EGEMEQVENGLKEKTLKKWLRMPMKR	---RLELYLKPKFSIBGSYQLEEVLPKLGIRIDFITS-DADLTGINSHSSIRVSE	VMHKAALVDEEGTEGAAA	361
bovSERPINA10	PMMYRSGK-FASTFDKFKHCHVLKLPYRGNASMLVVLVERIGDHLTLEEDYLTDLVDLWLRNMKTR	---KMEVFPFKFLDQKYMHELLKQMGVQKIFLFPWADLSLMVTERNLKVKSVL	QRATIEVDEEGTEAMAG	403
bovSERPINA14	DMMRKTER-MLYSREELHATMVKMPCKGNVSLTLMPLD--AGQFDTLKMKMTAKRAKLOKISDFR	---LVRLILPKLKSIFKINFKHLLPKIDPKHILTA-TAISQAITSKAPLNLE	ALHQAEIELSEHALTVDTA	373

Séquences codées par l'exon 5

bovSERPINA12	SGAQTLPMETP----	IRVKINHRFLLMIWETKMNNLLFFGKIVNPSGR-----	414	
bovSERPINA3-3	TGIGIERTFLR----	IIVRVNRPFLIAVVKDQTSIIIFLGKVTNPSEA-----	411	
bovSERPINA3-4	TGIGIERTFLR----	IIVRVNRPFLIAVVKDQTSIIIFLGKVTNPSEA-----	411	
bovSERPINA3-5	TGIGIERTFLR----	IIVRVNRPFLIAVVKDQTSIIIFLGKVTNPSEA-----	411	
bovSERPINA3-1	TGISMERTILR----	IIVRVNRPFLIAVVKDQTSIIIFLGKVTNPSEA-----	411	
bovSERPINA3-2	TGIGIERTFLR----	IIVRVNRPFLIAVVKDQTSIIIFLGKVTNPSEA-----	411	
bovSERPINA3-6	TGIGIERTFLR----	IIVRVNRPFLIAVVKDQTSIIIFLGKVTNPSEA-----	414	
bovSERPINA3-8	TGVKVGITSINN--	HPLSFNRPFLIAVVKDQTSIIIFLGKVTNPSEA-----	418	
bovSERPINA3-7	TAVVMATSSLLH--	TLTVSFNRPFLSIPCKEQTQSIIIFLGKVTNPKEA-----	417	
bovSERPINA11	SSLLSQPRSLNATSAPHAGFNRPFLLLLEWVETTESPLFLGKVVNPAAG	-----	422	
bovSERPINA7	VRFLNQPE--	TLLHPPIIQFDRSFLLLILEKNTSILFLGKVVDPTEV-----	411	
bovSERPINA4	PGSFATFWP-P----	ALWFNQFFLVIPSTNAQSIIFLGKVVNPTKP-----	418	
bovSERPINA5	TGMVITFKS--	ARLGSQRIVFNRPFLVILVKNKSHILFLGKVTRP-----	404	
bovSERPINA1	TFLEAIPMSLP----	PDVEFNRPFLCILYDRNTKSPFLVGVVNPQA-----	416	
bovSERPINA6	TRVSLSAAPGP----	LTLRFNRPFIIMIPDDFTWSSFLGKVVNPTKALPGAKLRLTRAPRPHRKGWEGSP	-----	430
bovSERPINA10	TLLEITAYYMP----	PIVKVDRPFLFIIEEETSRVFLGRVVDPTLL-----	452	
bovSERPINA14	IHTDNLKVPKAKEVPAVVKVPMKAKEVPAVVKVPMNTKEVPVTVKVNRPFLLFVEDEKTRDLFVGKVLNPQVE	-----	459	

Figure 28 (suite)

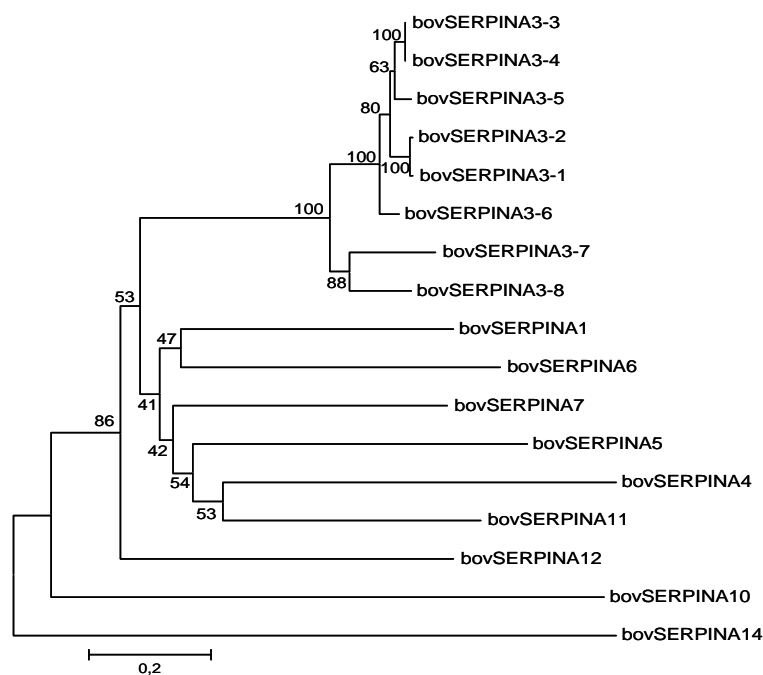


Figure 29 : Phylogénie des serpinines du clade A chez le bovin. Les séquences protéiques des serpinines A bovines répertoriées dans la base de données du NCBI et celles codées par le « cluster » de gènes *bovSERPINA3* ont été utilisées et alignées en utilisant le logiciel ClustalW2. L'analyse phylogénétique a été élaborée en utilisant le logiciel MEGA4 (Tamura et al., 2007) à partir de la méthode du Neighbour joining avec la matrice de substitution évolutive Jones-Taylor-Thornton (Jones et al., 1992) qui permet de prendre en compte les substitutions multiples d'acides aminés. Les valeurs de Bootstrap, indiquant la solidité des regroupements, supérieures à 50% sont indiquées.

Tableau XII : Séquences promotrices et facteurs de transcription pouvant se lier dans la région 5'UTR du gène *bovSERPINA3-3*. Ces séquences et facteurs de transcription ont été déterminés à l'aide du logiciel TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>).

Séquences promotrices	Facteurs de transcription pouvant se fixer à la séquence promotrice
TACTCACTGAGGAAGATGTGACAACCTCAGAAAACATCAAATGAATCACTG	AP-1 SRY
AAAACACTCTCAAATTATTGTTCTTTTTAAAGAGTTATTGACTCTGTTTT	SRY CdxA HFH-2
CCCAGGGAAATCCAAGTTAACATTGTGTTGTATTTATTAGTCACTTTTCT	AP-1 CdxA AP-1
AATCAAGCTGTAAAAAATAGTGTATTGCACACTCACACACACTTCAAAA	Pbx-1 CHOP-C CdxA TATA C/EBP alpha
GGTCCCAAAGTGTGTCAGAATACCAGTGTCTGGGGCCTCTGGTCTCCAG	AML-1a AP-1

SERPINA3-2, *A3-3* et *A3-6* du « cluster » bovin sont retrouvés. Quatre gènes du clade A sont localisés en amont de ces gènes *SERPINA3*. Outre les gènes du clade A, le gène *SERPING1*, appartenant au clade G est présent en amont des gènes *SERPINA3*. Ce gène *SERPING1* appartient aux gènes de classe II et présente donc, comme les gènes *SERPINA3* et *SERPINA1*, la même organisation structurale, 4 introns et 5 exons dont le premier est non codant.

Par ailleurs, l'amplification, le clonage et le séquençage d'une partie de la région (environ 1,5 kpb) située en amont du gène *bovSERPINA3-3* a été réalisée. L'analyse informatique de cette région par le logiciel TFSEARCH a permis de déterminer différentes séquences promotrices potentielles et différents sites de fixation de facteurs de transcription au sein de chaque séquence (tableau XII). Parmi les différents facteurs de transcription pouvant se fixer, comme les facteurs CdxA ou Pbx-1, on retrouve le facteur AP-1. Ce facteur est activé par la thiorédoxine (Trx) via l'activation de la voie des MAP kinases, notamment JNK, ce qui augmente alors son affinité pour son site de fixation à l'ADN (Das et Muniyappa, 2009). La protéine Trx est impliquée dans le maintien du potentiel oxydo-réducteur de la cellule et sa synthèse est fortement augmentée en cas de stress cellulaire (Ohira *et al.*, 1994). La mort de l'animal provoque un stress cellulaire. La cellule va alors augmenter le taux de thiorédoxine, qui permet d'accroître, à son tour, la quantité de facteur AP-1 actif. La fixation de ce dernier doit stimuler la transcription de différents gènes dont *bovSERPINA3-3*. Le nombre de serpinines intracellulaires peut alors augmenter. Ces anti-protéases vont inhiber différentes protéases et notamment la caspase 3 et ainsi freiner leur action. Le processus apoptotique se trouverait ralenti, ce qui diminuerait la vitesse de maturation du muscle en viande. Si le stress a lieu avant l'abattage, la quantité de serpinines sera encore plus importante *post-mortem* et ceci freinera d'autant plus la transformation du muscle en viande. Cette hypothèse mécanistique expliquerait alors pourquoi un animal stressé donne une viande plus dure qu'un animal « calme ».

Les séquences protéiques déduites et codées par l'ensemble des gènes du « cluster » *bovSERPINA3* montrent qu'il existe une très grande identité, supérieure à 74%, entre toutes les protéines. Cependant, les quelques différences sont principalement retrouvées dans la région du site actif ou RCL de ces serpinines. Ces protéines semblent également présenter des différences au niveau de leurs modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation ou le nombre de chaînes oligosaccharidiques (N- et/ou O-glycosylations). Ces variations doivent vraisemblablement leur conférer différents rôles physiologiques spécifiques.

Partie II

Etude des relations « structure-fonction » de la protéine bovSERPINA3-3

Les études de Tassy *et al.* (2005) et Brémaud *et al.* (2006) ont montré que les deux serpins extraites du muscle *diaphragma* possédaient une activité contre la trypsine et l'élastase, 2 protéases à sérine. En revanche, aucune activité inhibitrice n'avait pu être mise en évidence contre la papaïne et la cathepsine B, 2 protéases à cystéine commerciales. Cependant, cela ne signifie pas pour autant qu'elles ne sont pas en mesure d'inhiber une protéase à cystéine par un mécanisme d'inhibition croisée ou « cross-class inhibition », jamais encore décrit pour une serpine A3. Aussi, lors de son travail de thèse (2006), Carlos Herrera-Mendez a pu montrer que ces deux serpins musculaires bovines sont capables d'inhiber certaines protéases à cystéine de la famille des caspases, les caspases 3 et 8. Au cours de ma thèse, j'ai réalisé une étude des relations « structure-fonction » de la protéine bovSERPINA3-3 afin de mieux comprendre, notamment, le mécanisme d'inhibition de la caspase 3 par cette anti-protéase. Pour mener à bien ce travail, il a fallu, dans un premier temps, produire une protéine bovSERPINA3-3 recombinante sauvage active utilisée comme protéine référente et différentes protéines bovSERPINA3-3 recombinantes mutantes.

II.1 Activités anti-trypsique et anti-caspase 3 de la protéine bovSERPINA3-3 recombinante

II.1.1 Production de la protéine bovSERPINA3-3 recombinante sauvage

II.1.1.1 Choix du système de production

Pour produire une protéine recombinante, différents systèmes sont maintenant à la disposition des chercheurs. L'un d'entre eux a plus particulièrement retenu notre attention : il s'agit du système d'expression hétérologue procaryote. Il présente de nombreux avantages et la littérature cite de nombreux exemples de serpins produites dans un système d'expression procaryote qui conservent leur activité inhibitrice. Lorsque l'on veut produire une protéine dans un système hétérologue, il faut tenir compte de l'usage préférentiel des codons ou « biais de codons » qui peut différer entre les 2 organismes. Dans le cas présent, nous souhaitons produire une protéine bovine, donc une protéine d'un organisme eucaryote supérieur, dans une bactérie. Des codons préférentiels chez les mammifères peuvent être considérés comme rares chez la bactérie. Par exemple, le codon CCC de la proline représente près de 2% des

M	G	H	H	H	H	H	H	H	H	H	S	S	G	H	I	D	D	D	D	K	H	M	23
ATG	GGC	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	AGC	AGC	GGC	CAT	ATC	GAC	GAC	GAC	GAC	AAG	CAT	ATG	69
L	P	E	N	V	V	V	K	D	R	H	R	R	V	D	G	H	T	L	A	S	S	N	46
CTG	CCG	GAG	AAT	GTG	GTG	GTG	AAG	GAC	CGT	CAC	AGA	AGG	GTG	GAT	GGC	CAC	ACG	TTA	GCC	TCC	AGC	AAC	138
T	D	F	A	F	S	L	Y	K	Q	L	A	L	K	N	P	N	K	N	V	M	F	S	69
ACC	GAC	TTC	GCC	TTC	AGC	CTC	TAC	AAG	CAG	TTG	GCT	TTG	AAG	AAC	CCC	AAT	AAG	AAT	GTC	ATG	TTC	TCC	207
P	L	S	V	S	M	A	L	A	F	L	S	L	G	A	R	G	P	T	L	T	E	I	92
CCG	CTG	AGT	GTC	TCC	ATG	GCC	TTG	GCC	TTC	CTG	TCT	CTG	GGG	GCC	CGT	GGC	CCC	ACC	CTG	ACA	GAG	ATC	276
L	E	G	L	K	F	N	L	T	E	I	Q	E	T	Q	I	H	Q	G	F	Q	H	L	115
CTG	GAA	GGC	CTC	AAG	TTC	AAC	CTC	ACG	GAG	ATC	CAG	GAG	ACA	CAG	ATC	CAC	CAG	GGC	TTC	CAG	CAC	CTC	345
L	Q	A	L	N	R	P	R	N	Q	L	Q	L	S	V	G	N	A	M	F	V	Q	E	138
CTG	CAG	GCG	CTC	AAT	CGA	CCC	AGG	AAC	CAG	CTG	CAG	CTG	AGC	GTG	GGC	AAC	GCC	ATG	TTT	GTG	CAG	GAG	414
E	L	K	L	L	D	K	F	I	E	D	A	R	V	L	Y	S	S	E	A	F	P	T	161
GAG	GCC	TTC	CCG	ACC	GAG	CTG	AAG	CTG	CTG	GAC	AAG	TTC	ATA	GAA	GAT	GCC	CGT	GTG	CTG	TAC	TCC	TCC	483
N	F	R	D	P	E	A	A	K	S	L	I	N	D	Y	V	K	N	K	T	Q	G	K	184
AAC	TTC	AGG	GAT	CCT	GAA	GCT	GCC	AAG	AGT	CTA	ATA	AAT	GAC	TAT	GTG	AAG	AAT	AAA	ACC	CAG	GGG	AAA	552
I	E	E	L	F	K	D	L	S	P	R	T	E	L	V	L	V	N	Y	V	Y	F	K	207
ATT	GAG	GAG	CTG	TTC	AAG	GAC	CTT	TCC	CCA	AGA	ACG	GAG	TTG	GTC	CTG	GTG	AAT	TAC	GTC	TAC	TTT	AAA	621
A	Q	W	K	T	R	F	D	P	K	H	T	E	Q	A	E	F	H	V	S	D	N	K	230
GCC	CAA	TGG	AAG	ACC	CGC	TTT	GAC	CCC	AAA	CAC	ACT	GAG	CAG	GCA	GAG	TTC	CAC	GTG	AGC	GAC	AAC	AAG	690
T	V	E	V	P	M	M	T	L	D	L	E	T	P	Y	F	R	D	E	E	L	G	C	253
ACG	GTG	GAG	GTG	CCC	ATG	ATG	ACC	CTT	GAC	CTG	GAA	ACC	CCT	TAC	TTC	CGG	GAC	GAG	GAG	CTG	GGC	TGC	759
T	L	V	E	L	T	Y	T	S	N	D	S	A	L	F	I	L	P	D	K	G	K	M	276
ACG	CTG	GTG	GAG	CTC	ACG	TAC	ACC	AGC	AAC	GAC	AGC	GCC	CTC	TTC	ATC	CTC	CCC	GAC	AAG	GGC	AAA	ATG	828
Q	D	L	E	A	K	L	T	P	E	M	L	T	R	W	R	N	S	L	Q	P	R	R	299
CAG	GAC	CTG	GAA	GCC	AAG	CTG	ACC	CCG	GAG	ATG	CTG	ACG	AGG	TGG	GCA	AAC	TCC	CTG	CAG	CCC	AGA	CGA	897
I	H	E	L	Y	L	P	K	F	S	I	K	S	N	Y	E	L	N	D	T	L	S	Q	322
CAT	GAA	CTC	TAC	CTG	CCA	AAA	TTT	TCC	ATC	ATA	AAA	AGC	AAC	TAT	GAA	CTG	AAT	GAC	ACC	CTC	TCC	CAG	966
M	G	I	K	K	I	F	T	D	A	D	L	S	G	I	T	G	T	A	D	L	V	V	345
ATG	GGC	ATT	AAG	AAA	ATA	TTC	ACC	GAC	GCT	GAC	CTG	TCA	GGA	ATC	ACA	GGG	ACC	GCG	GAC	CTG	GTA	GTC	1035
S	Q	V	V	H	G	A	A	L	D	V	D	E	E	G	T	E	G	A	A	A	T	G	368
TCC	CAG	GTG	GTC	CAC	GGC	GCT	GCG	CTG	GAC	GTG	GAT	GAG	GAG	GGC	ACG	GAA	GGT	GCT	GCT	GCC	ACG	GGA	1104
I	G	I	E	R	T	F	L	R	I	I	V	R	V	N	R	P	F	L	I	A	V	V	391
ATC	GGC	ATA	GAA	AGA	ACG	TTC	TTG	AGA	ATC	ATT	GTG	CGT	GTC	AAC	AGG	CCC	TTC	CTG	ATT	GCC	GTA	GTT	1173
L	K	D	T	Q	S	I	I	F	L	G	K	V	T	N	P	S	E	A	*				410
CTC	AAA	GAC	ACC	CAG	AGC	ATC	ATC	TTT	TTG	GGG	AAA	GTC	ACC	AAC	CCC	AGT	GAA	GCC	TAG				1230

Figure 30 : Séquence de la protéine bovSERPINA3-3 recombinante mature produite dans le système BL21 / pET19b. La séquence de la protéine mature bovSERPINA3-3 est représentée en rouge, la séquence protéique vectorielle contenant la queue poly-histidine en position N-terminale est représentée en noir. Les nucléotides écrits en blanc sur fond noir correspondent aux nucléotides modifiés, lors de la PCR, pour augmenter l'efficacité traductionnelle dans un système procaryote. Les résidus aspartate D332, D334, D371 (selon la numérotation de la protéine mature) et surlignés en bleu sont les résidus qui ont été modifiés par mutagenèse dirigée. Les sites de restriction NdeI et BamHI (non représenté) permettent l'insertion du cDNA dans le vecteur.

codons des gènes codant des protéines du génome bovin alors que chez la bactérie *Escherichia coli* cette fréquence n'est que de 0,6%. Si de tels codons sont trop fréquemment présents, en particulier au début de la séquence de la protéine, l'efficacité de la traduction peut-être diminuée. Pour palier cette difficulté, 3 codons rares de la protéine bovSERPINA3-3 ont été modifiés lors de la construction du vecteur recombinant (figure 30). Nous avons également opté pour l'utilisation de la souche bactérienne commerciale BL21-CodonPlus® (DE3)-RP. En plus d'avoir intégré dans son génome le gène codant l'ARN polymérase du bactériophage T7, cette souche possède un plasmide portant les gènes codant respectivement les ARNs de transfert correspondant aux codons AGA et AGG de l'arginine et CCC de la proline.

II.1.1.2 Choix du vecteur

De nombreux vecteurs sont aujourd'hui commercialisés. Notre choix s'est porté sur le vecteur pET-19b. Il s'agit d'un plasmide circulaire double brin de 5,7 kpb. Il est utilisé pour l'expression de protéines recombinantes dans les bactéries BL21 (DE3). Dans le système pET / BL21 (DE3), l'expression du gène cloné est sous la dépendance de l'opérateur de l'opéron lactose (réprimé par le produit du gène *lac I*) et du promoteur reconnu par l'ARN polymérase du bactériophage T7. En présence d'IPTG, ce vecteur permet la production de la protéine recombinante. Ainsi, la protéine recombinante bactérienne produite est la protéine bovSERPIN3-3 dépourvue de peptide signal (c'est-à-dire mature) et possédant une séquence poly-histidine. Cette queue à son extrémité N-terminale a été ajoutée en position N-terminale afin de ne pas perturber la conformation du RCL qui se trouve du côté C-terminal.

II.1.1.3 Purification de la protéine recombinante bovSERPINA3-3

Pour son utilisation ultérieure dans diverses études biochimiques et structurales, la protéine recombinante bovSERPINA3-3 a dû être purifiée. L'utilisation du vecteur pET-19b, permet la production de la protéine recombinante avec une queue poly-histidine en position N-terminale. Cette extension permet de purifier la protéine par chromatographie d'affinité sur résine de nickel. La purification a été effectuée en conditions non dénaturantes afin de conserver la protéine recombinante sous forme native et active. Les différentes étapes de purification de la protéine recombinante bovSERPINA3-3 sont indiquées sur la figure 31.

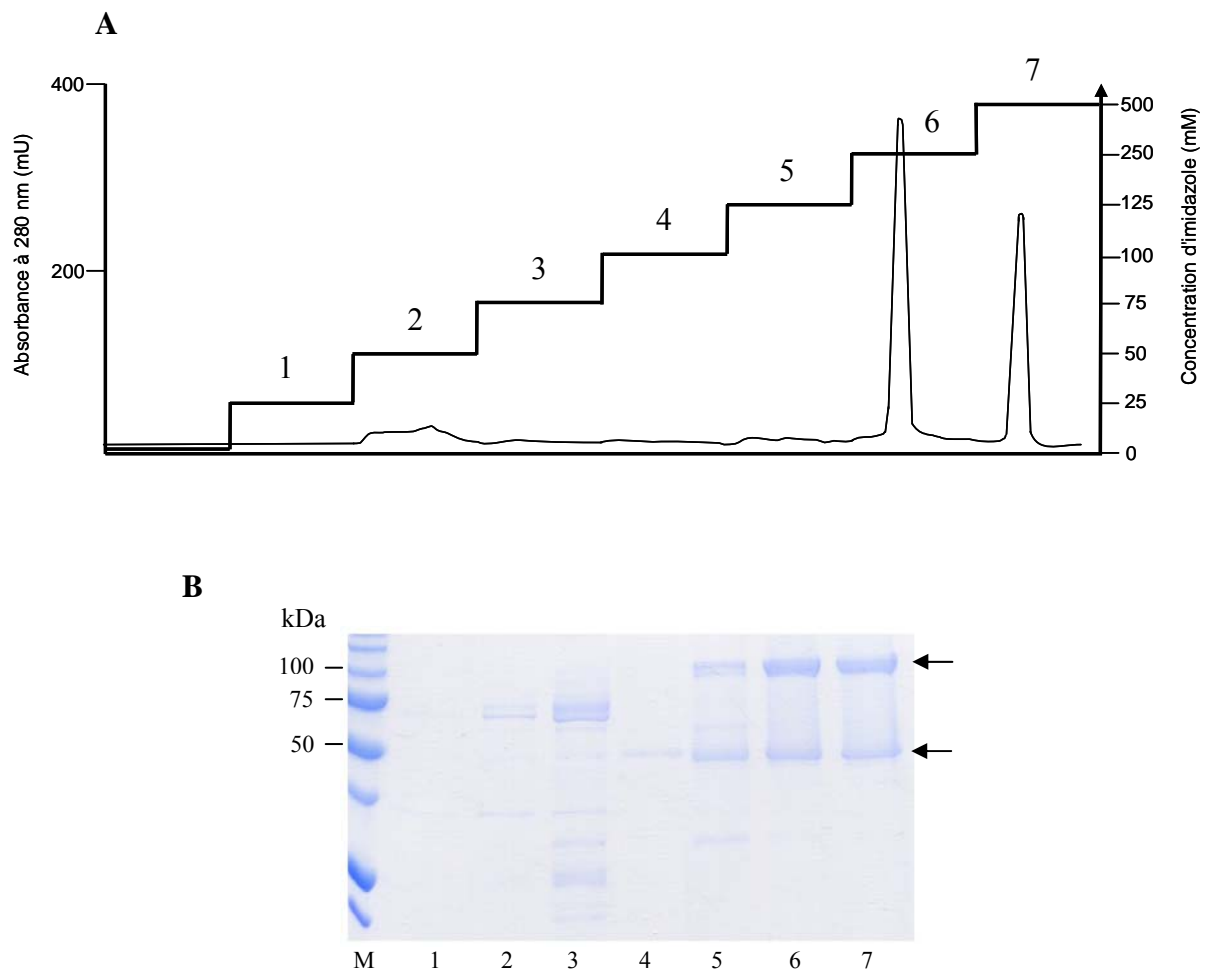


Figure 31 : Les différentes étapes de la purification de la protéine bovine SERPINA3-3 recombinante. (A) Purification de la protéine recombinante réalisée par chromatographie d'affinité sur résine de nickel. L'éluion de l'anti-protéase s'effectue par palier croissant en concentration d'imidazole. (B) Electrophorégramme des différentes étapes de la purification. Un aliquot (10 ou 20 μ l) des différentes fractions est analysé en SDS/PAGE sur gel discontinu 12%. Les flèches indiquent la protéine purifiée sous deux formes, une forme minoritaire monomérique d'environ 50 kDa et une forme majoritaire d'environ 100 kDa (pistes 6 et 7). M, marqueur de taille ; Pistes 1 à 7, aliquots des fractions correspondant aux différents paliers contenant 25, 50, 75, 100, 125, 250 et 500 mM d'imidazole, respectivement.

II.1.2 Mesure des activités inhibitrices

Afin de vérifier si la protéine recombinante bovSERPINA3-3 produite chez la bactérie *E. coli*, donc dépourvue de maturations post-traductionnelles, et purifiée conserve ses propriétés inhibitrices, différents tests d'activité ont été réalisés. La protéine bovSERPINA3-3 extraite du muscle squelettique bovin présente une activité contre la trypsine. Les premiers tests biochimiques sur la protéine recombinante ont donc été réalisés sur cette même protéase à sérine commerciale. Notre attention s'est également portée sur une protéase à cystéine, la caspase 3. En effet, il est établi aujourd'hui que, dans le muscle *post-mortem*, aucun phénomène de nécrose ne se produit. L'apoptose semble le seul mécanisme mis en place. Ce mécanisme de mort cellulaire programmée met en jeu une famille de protéases à cystéine, les caspases. Nous avons donc cherché à déterminer si la protéine recombinante bovSERPINA3-3 était une cible de ces caspases, notamment la caspase 3, la plus étudiée des caspases effectrices. Les tests ont été réalisés en utilisant la caspase 3 humaine. Nous avons également cherché à identifier le résidu cible de cette protéase à cystéine.

II.1.2.1 Mécanisme d'action de la trypsine et de la caspase-3

La trypsine est une endoprotéase qui hydrolyse en position C-terminale les liaisons peptidiques dans lesquelles un acide aminé basique, la lysine (K) ou l'arginine (R), engage sa fonction acide. La caspase 3 est une protéase à cystéine impliquée dans le mécanisme d'apoptose. A l'instar des autres caspases, elle clive son substrat cible du côté C-terminal d'un résidu aspartate (D) présent dans un site de reconnaissance spécifique. Dans le cas de la caspase 3 humaine, ce site correspond au motif DEVDX ou DMQDX avec X correspondant à n'importe quel acide aminé en dehors de la proline.

II.1.2.2 Mécanisme(s) d'inhibition

Lors d'une réaction réversible, la vitesse d'association est définie par l'équation :

$$v = -d[E] / dt = k_{\text{ass}} [E] [I] - k_{\text{diss}} [EI]$$

avec [E], [I], [EI] les concentrations en enzyme libre, en inhibiteur libre et en complexe enzyme-inhibiteur, respectivement, et t le temps. En revanche, dans le cas d'une inhibition irréversible (cf. VII.5 Mécanisme d'inhibition des serpinés), la constante de dissociation k_{diss} , est particulièrement lente et peut donc être négligée.

L'équation devient alors :

$$v = -d[E] / d(t) = k_{\text{ass}} [E] [I]$$

Si la valeur de k_{diss} est suffisamment faible, l'équation peut être utilisée pour décrire une inhibition réversible, du moins pendant les premières étapes du processus d'inhibition. Lorsque l'association enzyme / inhibiteur est suffisamment rapide, la constante d'association peut être déterminée en incubant des quantités équimolaires d'enzyme et d'inhibiteur.

Pour la trypsine, la méthode utilisée est celle décrite par Beatty *et al.* (1980) basée sur l'équation :

$$t_{0,5} = 0,693/k_{\text{ass}} [I]$$

La représentation semi-logarithmique de v_i/v_o (vitesse de réaction en l'absence v_o ou en présence v_i d'inhibiteur) en fonction du log de t est une droite dont l'équation permet de déterminer $t_{0,5}$, le temps nécessaire à l'inhibiteur pour réduire l'activité enzymatique de 50%. Connaissant $t_{0,5}$, la constante d'association peut être calculée à partir de l'équation ci-dessus selon des conditions de pseudo-premier ordre.

En pratique, des concentrations équivalentes (5 nM) en trypsine et en inhibiteur purifié sont pré-incubées dans un tampon Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 20 mM, pH 8,0 dans un volume réactionnel de 200 µl final pendant une durée allant de 0 à 10 minutes. Le substrat N-CBZ-Phe-Arg-AMC est ensuite ajouté (50 µl à 100 µM) puis l'activité résiduelle est mesurée par spectro-fluorométrie ($\lambda_{\text{excitation}}=360$ nm et $\lambda_{\text{émission}}=440$ nm).

Pour mesurer l'activité anti-caspase 3, la constante d'association est déterminée par la méthode de courbes décrite par Zhou *et al.* (1997).

En pratique, une solution à 1 nM (dans un volume de 30 µl) de caspase 3 est incubée en présence de substrat (50 µl à 100 µM) (N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-AMC). La lecture est alors faite selon les mêmes conditions que dans le cas de la trypsine. Lorsque la vitesse devient constante, différentes concentrations d'inhibiteur (de 1 à 50 nM) sont ajoutées au mélange réactionnel et la diminution de fluorescence est mesurée pendant 20 minutes au minimum. Pour chaque concentration d'inhibiteur, la constante de premier ordre k_{obs} est déterminée selon l'équation :

$$\ln ([P]_{t+\Delta t} - [P]_t) = C - k_{\text{obs}}t$$

Où $[P]_{t+\Delta t}$ est la concentration du produit fluorescent au temps t + Δt de la réaction d'association et $[P]_t$ est la concentration du produit fluorescent au temps t.

La représentation graphique de la concentration en inhibiteur en fonction des différentes valeurs de k_{obs} obtenues permet de tracer une droite dont la pente est k'_{obs} . La constante de vitesse de deuxième ordre (k_{ass}) est alors déterminée par la relation suivante :

$$k_{ass} = k'_{obs} (1 + S/K_m)$$

II.1.2.3 Inhibition de la trypsine et de la caspase 3 par la protéine recombinante bovSERPINA3-3

L'anti-protéase recombinante purifiée est capable d'inhiber la trypsine avec une constante d'association similaire à celle de la protéine extraite du muscle squelettique bovin. Pour l'inhibition de la trypsine, la constante d'association calculée dans le cas de la serpine produite dans la bactérie est de $1,87 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, valeur voisine de celle calculée pour la serpine musculaire ($0,67 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; tableau XIII). Il semble donc que les modifications post-traductionnelles telles que la *N*-glycosylation, absentes pour la protéine recombinante bactérienne, ne soient pas nécessaires à l'activité inhibitrice de l'anti-protéase. De la même manière, les serpines bovSERPINA3-3 musculaire et recombinante sont capables d'inhiber la caspase 3. Les constantes d'association sont élevées : $1,55 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour la serpine musculaire et $9,04 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour la serpine recombinante.

Tableau XIII : Constantes d'association (k_{ass}) des protéines bovSERPINA3-3 musculaire, recombinante sauvage et mutantes. N.I., pas d'inhibition.

Protéine recombinante / Protéase cible	$k_{ass} (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	
	Trypsine ($\times 10^6$)	Caspase 3 ($\times 10^5$)
bovSERPINA3-3 musculaire purifiée	0,67	1,55
bovSERPINA3-3 référente	1,87	9,04
bovSERPINA3-3 D332A	0,29	N.I.
bovSERPINA3-3 D334A	30,5	N.I.
bovSERPINA3-3 D371A	0,79	N.I.

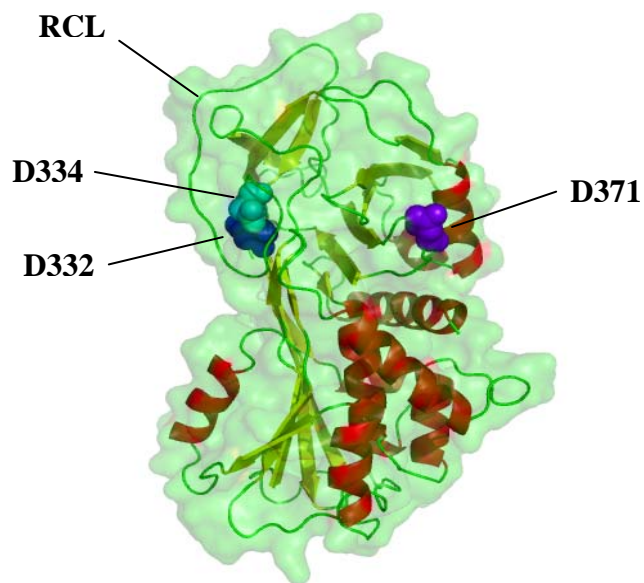


Figure 32 : Structure tri-dimensionnelle d'un monomère de la protéine bovSERPINA3-3 vu par transparence à travers la surface moléculaire. La structure secondaire est colorée en rouge pour les hélices, en jaune pour les brins des feuillettes β et en vert pour les boucles. Les 3 résidus aspartate D332, D334 et D371 sont représentés par des sphères bleue, verte et violette, respectivement. Les résidus D332 et D334 sont enfouis sous le RCL, localisé en haut à gauche.

II.1.2.4 Identification de l'acide aminé cible de la caspase 3

Une caspase est une enzyme qui clive après un résidu D contenu dans un motif de reconnaissance, par exemple le motif DEVD dans le cas de la caspase 3 humaine. A l'intérieur et autour de la boucle définissant le RCL, on retrouve trois résidus aspartate. Deux sont situés en amont du RCL, en position 332 et 334 (selon la numérotation de la protéine mature), et un est situé en aval en position 37 dans le RCL (ou 371 selon la numérotation de la protéine mature), respectivement (figure 30). De plus, les deux résidus D332 et D334 sont contenus dans le motif DVD, proche de celui de reconnaissance de la caspase 3 humaine. Aussi, ai-je réalisé différentes protéines recombinantes mutantes dans lesquelles ces résidus ont été modifiés en alanine. Ces mutations ont été réalisées à l'aide du kit QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Les tests d'activité réalisés montrent que ces protéines mutantes conservent une activité inhibitrice vis-à-vis de la trypsine (tableau XIII). En revanche, ces protéines ne présentent plus aucune activité contre la caspase 3. Pour essayer de comprendre ce résultat et déterminer quel est l'acide aminé cible, une modélisation de la protéine recombinante bovSERPINA3-3 a été entreprise. Cette représentation tridimensionnelle (figure 32) a été réalisée en collaboration avec le Dr Christophe Combet, de l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP-UMR5086-CNRS/Université de Lyon). Ainsi, les résidus situés en amont du RCL sont enfouis sous la boucle formée par ce RCL. Toute modification de ces acides aminés entraîne une modification de l'espace ce qui déstabilise la boucle du RCL. La reconnaissance et la fixation de la caspase 3 seraient alors perturbées, d'où l'absence d'inhibition. Le résidu D371 est quant à lui localisé sur la face externe de la molécule et accessible. Il serait donc la cible de la caspase 3.

II.1.2.5 Formation de complexes entre l'anti-protéase et les protéases à sérine

Une des caractéristiques des serpins est de former des complexes stables avec leur cible en conditions dénaturante et réductrice. Pour la première fois, nous avons pu montrer qu'une serpine formait un complexe stable en SDS-PAGE avec une protéase à cystéine appartenant à la famille des caspases. Par exemple, la serpine du virus cowpox CrmA ne forme pas de liaison covalente avec la caspase 3. De plus, avec la serpine mutée, aucun complexe n'a pu être obtenu. Ceci montre bien que l'acide aminé D371 est la cible de la caspase-3. En revanche, ce résidu n'est pas situé dans le motif « habituel » de reconnaissance et de clivage de la caspase-3, le motif DEVD ou DMQD. L'absence d'inhibition montre que,

dans notre cas, la caspase-3 présente une « souplesse » dans la reconnaissance de son substrat. L'ensemble de ce travail a ainsi fait l'objet de la publication suivante parue dans le journal « *FEBS Letters* ».

**Inhibition of human initiator caspase 8 and effector caspase 3 by cross-class
inhibitory bovSERPINA3-1 and A3-3**

Herrera-Mendez C.H.*, Becila S.*, **Blanchet X.***, Pelissier P., Delourme D., Coulis G.,
Sentandreu M.A., Boudjellal A., Bremaud L. & Ouali A.
(*contribution équivalente)

FEBS Letters, 2009, 583(17):2743-2748

II.2 Phénomène de dimérisation

II.2.1 Polymérisation et dimérisation des serpins

Une caractéristique des serpins est leur aptitude à la dimérisation et la polymérisation. C'est, par exemple, le cas de l'antithrombine qui, lorsque qu'elle est mutée, se présente sous forme dimérique (Lomas, 2006). Dans certaines biopsies pathologiques, le phénomène de dimérisation des serpins a pu être observé et peut même s'étendre et conduire à la polymérisation d'unités répétées de la protéine. Comme pour l' α_1 -antitrypsine dans le cas de la mutation Z. Le degré de polymérisation est si important qu'il devient alors possible d'observer, par microscopie électronique, des « colliers » de protéines dans les cellules hépatiques (Lomas, 2006). Différents modèles structuraux ont été réalisés afin de permettre de mieux appréhender la formation de polymères pathologiques de serpins (cf. VII.8 Maladies associées aux serpins).

De façon expérimentale, un inhibiteur de trypsine extraite du plasma bovin se présente sous forme dimérique après migration en conditions dénaturantes (Christensen et Sottrup-Jensen, 1994). De la même manière, la serpine bovSERPINA3-1 extraite du muscle squelettique se présente majoritairement sous une forme dimérique (Tassy *et al.*, 2005). A ce jour, aucune étude n'a été entreprise pour expliquer le phénomène de dimérisation et de polymérisation observé *in vitro*.

II.2.2 Dimérisation de la protéine bovSERPINA3-3

Les serpins bovSERPINA3-3 musculaire et recombinante migrent de manière similaire sous forme dimérique en SDS/PAGE. Cette dernière, cependant, perd cette faculté de dimérisation lorsque le résidu aspartate en position 371 est muté en alanine.

Afin de mieux comprendre ce phénomène de dimérisation *in vitro*, Plusieurs études ont été menées. Une collection de mutants a été réalisée dans lesquels le résidu aspartate a été remplacé par successivement un résidu asparagine, qui permet le même encombrement stérique que l'aspartate mais qui n'est pas chargé, et par un résidu glutamate qui permet de conserver une charge négative mais pas le même encombrement. Nous avons également étudié le comportement de ces dimères dans différentes conditions électrophorétiques et plus particulièrement en condition native (PAGE). Enfin, en collaboration avec le Dr Christophe Combet (UMR 5086, « Institut de Biologie et de Chimie des Protéines », Lyon), nous avons proposé un modèle structural de dimérisation de la protéine bovSERPINA3-3. Cette étude a

fait l'objet d'un article qui sera prochainement soumis au journal « *Protein Science* ». Ainsi, le changement de l'aspartate par un résidu asparagine permet d'obtenir un ratio dimère/monomère de 3/1. La modification de l'aspartate en glutamate donne 50% de forme dimérique et 50% de forme monomérique. Pour que le phénomène de dimérisation se produise, il faut donc la présence d'une charge négative ainsi qu'un encombrement stérique strict qui permet de maintenir l'interface.

Mutagenesis of the bovSERPINA3-3 demonstrates the requirement for aspartate-371 for inter-molecular interaction and formation of dimers

Blanchet X., Péré A., Duprat N., Pinault E., Delourme D., Pélissier P., Ouali A.,
Combet C. & Brémaud L.

A Soumettre au journal « *Protein Science* »

II.3 Glycosylation de la protéine bovSERPINA3-3

Les serpines sont des protéines qui sont modifiées post-traductionnellement notamment par des ajouts de chaînes oligosaccharidiques de type *N*-glycosidiques. La serpine bovSERPINA3-3 possède une masse moléculaire d'environ 75 kDa supérieure à sa masse théorique d'environ 47 kDa. Ceci suggère donc la présence, entre autre, de chaînes *N*-glycosylées. En effet, dans la séquence de la protéine mature, 5 sites potentiels de *N*-glycosylation sont présents. Afin d'évaluer le nombre de sites réellement occupés par des chaînes oligosaccharidiques, l'impact de ces *N*-glycosylations sur la stabilité et l'activité de la serpine étudiée, la synthèse de cette anti-protéase a été réalisée dans un organisme eucaryote, capable de réaliser la *N*-glycosylation. Parmi les différents systèmes existant tels que les cellules eucaryotes de mammifères ou d'insectes, notre choix s'est porté sur la levure *Saccharomyces cerevisiae*. En effet, ce système offre différents avantages. Outre le fait de réaliser des modifications post-traductionnelles complexes comme l'ajout de sucres, le système levure est peu coûteux, plus facilement manipulable que des cellules eucaryotes mais surtout permet d'obtenir une grande quantité de protéines d'intérêt en un minimum de temps. Cependant, bien que la levure soit capable de réaliser des *N*-glycosylations, ces dernières sont différentes de celles retrouvées chez les eucaryotes supérieurs ; la levure ne permet pas, par exemple, l'ajout d'acide sialique. Mais, dans un tel système, même si la composition des chaînes *N*-glycosidiques est différente de celle du bovin, le nombre de sites occupés pour une protéine reste identique.

II.3.1 La *N*-glycosylation chez la levure

La glycosylation des protéines se déroule dans deux compartiments cellulaires distincts ; elle débute dans le réticulum endoplasmique granuleux (REG) puis se poursuit dans l'appareil de Golgi. Dans le REG, un précurseur oligosaccharidique $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (3 résidus glucose, 9 mannoses et 2 *N*-acétylglucosamines) est assemblé sur un transporteur lipidique, le dolicholpyrophosphate, puis transféré en bloc sur un résidu asparagine (N) de la protéine en cours de synthèse. Cet acide aminé, sur lequel se greffe le premier *N*-acétylglucosamine, est contenu dans une séquence consensus de type N-X-S/T où X peut être n'importe quel acide aminé à l'exception de la proline. Lors de son transfert, ce précurseur est modifié. Il y a chez la levure, à l'exception de *Schizosaccharomyces pombe*, élimination des 3 résidus glucose et d'un résidu mannose. La structure pentasaccharidique $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$

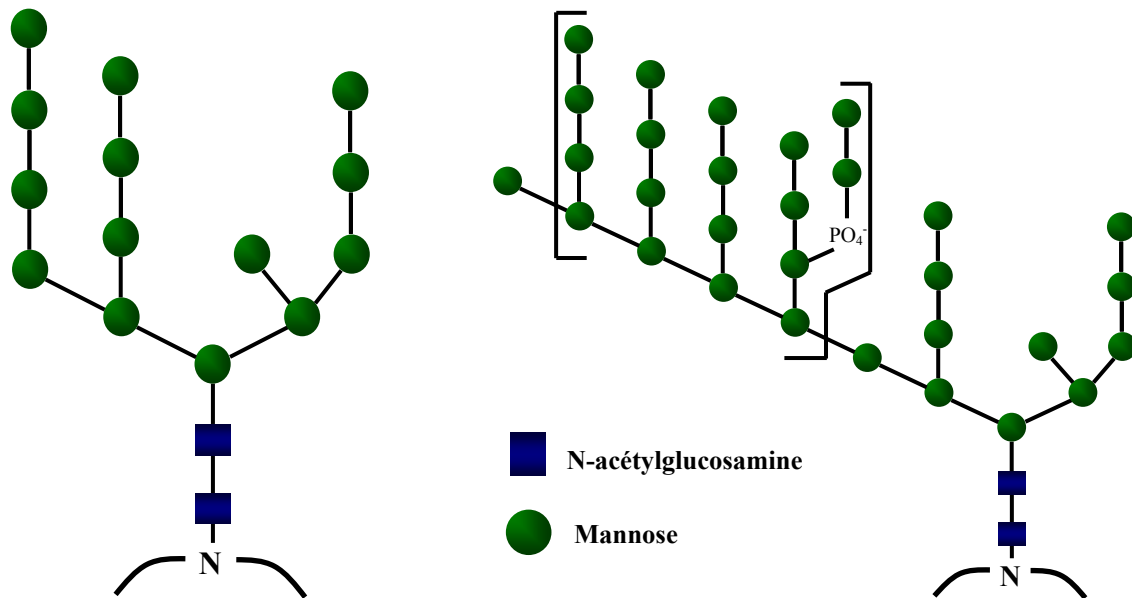


Figure 33 : Structure des N-glycosylations chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Deux types de N-glycosylation sont rencontrés : une petite ramification (à gauche) et une très grande ramification (à droite).

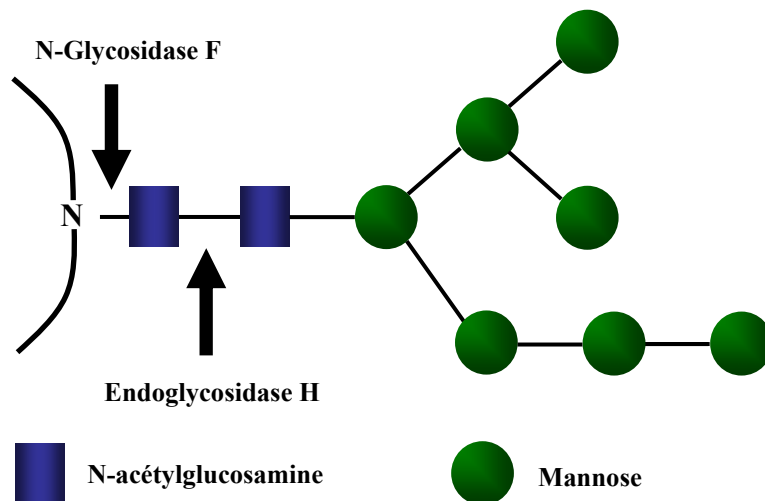


Figure 34 : Mécanismes d'action des N-Glycosidase F et de l'Endoglycosidase H. La première enzyme clive entre le résidu asparagine (N) et le premier résidu N-acétylglucosamine libérant ainsi la totalité du glycanne. La seconde enzyme clive la chaîne entre les deux résidus N-acétylglucosamine.

constitue d'ailleurs le « cœur » commun à tous les *N*-glycanes, rencontrés chez tous les eucaryotes. Les chaînes oligosaccharidiques sont ensuite allongées soit par ajout de résidus mannoses exclusivement soit par ajout de résidus mannoses et de galactoses à la structure saccharidique $\text{Man}_{8-9}\text{GlcNAc}_2$ formant ainsi des ramifications (figure 33). L'extension des oligosaccharides peut être de deux formes : un petit allongement (<15 sucres) ou un grand allongement pouvant aller jusqu'à 200 sucres ajoutés, comme chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

De plus, des mannoses porteurs d'un groupement phosphate peuvent se fixer sur certains résidus mannose via une liaison phosphoester. Ceci permettra d'allonger les ramifications avec des résidus mannose supplémentaires (Gemmill et Trimble, 1999).

II.3.2 Production de la protéine bovSERPINA3-3 chez *S. cerevisiae*

Afin de déterminer le nombre de sites de glycosylation réellement occupés et leur implication dans la stabilité et/ou l'activité de l'anti-protéase, la protéine a été produite, par la société GLYCODE (Uzerche, France), chez la levure *S. cerevisiae*. En conditions dénaturantes, cette protéine migre sous deux formes très proches de 60 et 57 kDa (figure 35 piste 1). Ces tailles sont très inférieures à celle de la protéine bovSERPINA3-3 musculaire (75 kDa). Deux hypothèses sont alors envisageables. Cette différence pourrait être attribuée à une absence de chaînes oligosaccharidiques sur l'un des sites. En revanche, si on considère que toutes les modifications post-traductionnelles sont effectuées chez la levure et que le nombre de sites de *N*-glycosylation occupés est identique, la différence de migration électrophorétique observée pourrait être attribuée à la composition des chaînes oligosaccharidiques. Ainsi, la protéine produite chez *S. cerevisiae* adopterait une conformation tridimensionnelle différente qui doit perturber sa migration. Cette hypothèse conformationnelle pourrait également expliquer l'absence, chez la levure, de la forme dimérique observée chez le bovin. Afin de vérifier le nombre de sites réellement occupés, une déglycosylation ménagée a été réalisée en présence de la *N*-Glycosidase F (PNGase F). Cette enzyme, produite par *Flavobacterium meningosepticum*, est une amidase qui clive tous les *N*-glycannes à l'exception du fucose lorsqu'il est lié sur le premier *N*-acétylglucosamine. Le résidu asparagine porteur du glycanne est alors désaminé et transformé en résidu aspartate. La chaîne oligosaccharidique est donc clivée (figure 34).

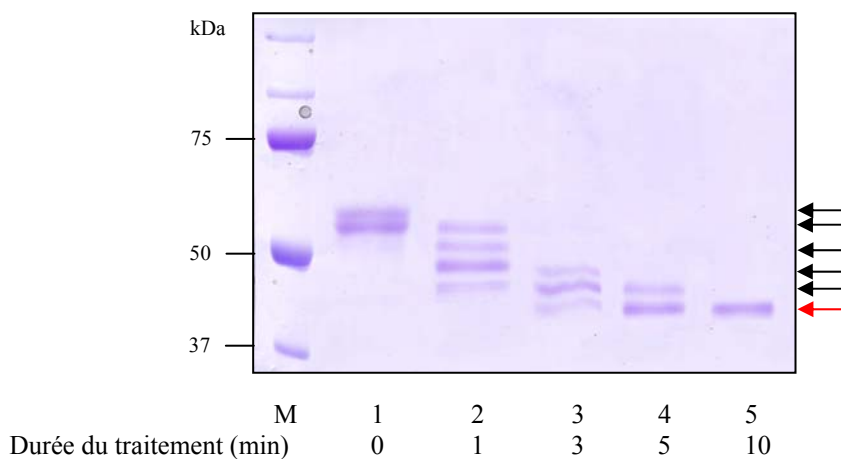


Figure 35 : Déglycosylation ménagée de la protéine bovine SERPINA3-3 produite chez la levure *S. cerevisiae*. La protéine bovine SERPINA3-3 (6,5 µg), d'une taille théorique de 44,8 kDa, a été soumise à une déglycosylation ménagée à 94°C par l'amidase PNGase F (2,5 unités d'enzyme). Un aliquot est prélevé aux temps 1, 3, 5 et 10 minutes (pistes 2 à 5, respectivement) puis soumis à une migration en SDS-PAGE 12 % suivie d'une coloration au bleu de Coomassie. Les 5 flèches noires représentent les 5 différents états de glycosylation de la protéine. La flèche rouge représente la forme totalement déglycosylée de la protéine.

Lorsque la réaction est réalisée en conditions ménagées, chaque site peut être libéré de manière séquentielle. Ainsi, cette réaction permet de déterminer le nombre réel de sites occupés. Les conditions expérimentales, décrites dans la légende de la figure 35, nous permettent de visualiser 5 niveaux de *N*-glycosylation conduisant à des protéines de 60, 57, 54,6, 52,3 et 46,6 kDa. La forme entièrement déglycosylée est estimée à 44,1 kDa, et très proche de la taille théorique de la protéine (44,8 kDa). Selon ces masses moléculaires calculées, nous pouvons en déduire que le cœur pentasaccharidique est ramifié et allongé de 13 résidus mannose. Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation de l'endoglycosidase H (Endo H), une glycosidase produite par *Streptomyces plicatus* qui clive entre les deux *N*-acétylglucosamines d'un *N*-glycane hypermannosylé (résultats non montrés). Les 5 sites potentiels de *N*-glycosylation de la protéine bovSERPINA3-3 sont donc réellement 5 sites de *N*-glycosylation occupés.

II.3.3 Tests d'activité

Afin d'évaluer l'impact des modifications post-traductionnelles sur la stabilité et les propriétés inhibitrices de cette anti-protéase produite chez la levure, des tests d'activité ont été réalisés à la fois sur la trypsine et la caspase 3. De façon inattendue, aucune activité inhibitrice n'a pu être obtenue contre ces 2 protéases. De plus, la déglycosylation totale de la protéine produite chez la levure ne permet pas de restaurer ses propriétés inhibitrices. De la même manière que ces modifications entraînent un changement conformationnel irréversible qui empêche la formation de dimères, nous pouvons supposer que la conformation protéique adoptée chez la levure ne permet plus d'exposer la boucle du site actif. La fixation des protéases ne peut donc plus être effectuée.

Partie III

Quantification des serpins A3 bovines par test ELISA

III.1 Pourquoi ce test ELISA ?

La mise au point de ce test a été envisagée afin de disposer, à terme, d'un dosage rapide des protéines inhibitrices bovSERPINA3s. Ce dosage doit permettre de quantifier ces serpins dans différents tissus et organes mais aussi dans différents échantillons musculaires phénotypés pour leurs caractéristiques de maturation. La quantification d'une enzyme dans un extrait tissulaire repose essentiellement sur deux méthodes : la mesure de l'activité enzymatique et le dosage de l'enzyme par des techniques immunochimiques. La quantification par mesure de l'activité enzymatique se heurte à plusieurs problèmes majeurs tels que le nombre limité d'échantillons pouvant être analysés simultanément et également le rendement de l'extraction protéique. En effet, dans le cas d'inhibiteurs enzymatiques, la mesure de l'activité s'effectue contre une protéase cible et nécessite une étape de purification préalable obligatoire. La mesure de l'activité enzymatique représente donc une solution peu envisageable à grande échelle, en raison des difficultés techniques qu'elle peut occasionner et du temps nécessaire à la purification.

Pour contourner ces difficultés, nous nous sommes orientés vers des méthodes immunochimiques de type ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), qui s'avèrent beaucoup plus spécifiques, plus rapides et parfaitement reproductibles. Elles permettent en outre de travailler sur des extraits bruts de muscle, sans fractionnement préalable, et d'analyser un très grand nombre d'échantillons simultanément. Ce test est rendu possible car nous disposons d'un anticorps polyclonal de lapin immunisé avec l'anti-protéase bovSERPINA3-1 qui est dirigé contre l'ensemble des serpins A3 bovines.

Un premier test ELISA a été mis au point (Herrera-Mendez, 2006) dans lequel les protéines bovSERPINA3-1 et bovSERPINA3-3 extraites du muscle bovin étaient utilisées comme protéines référentes. La procédure de purification de ces dernières étant très lourde, il n'est pas envisageable d'utiliser ce test à grande échelle. Ainsi, le travail qui m'a été confié, ces derniers mois, a consisté à mettre au point un test ELISA en utilisant l'anti-protéase bovSERPINA3-3 recombinante bactérienne comme protéine référente.

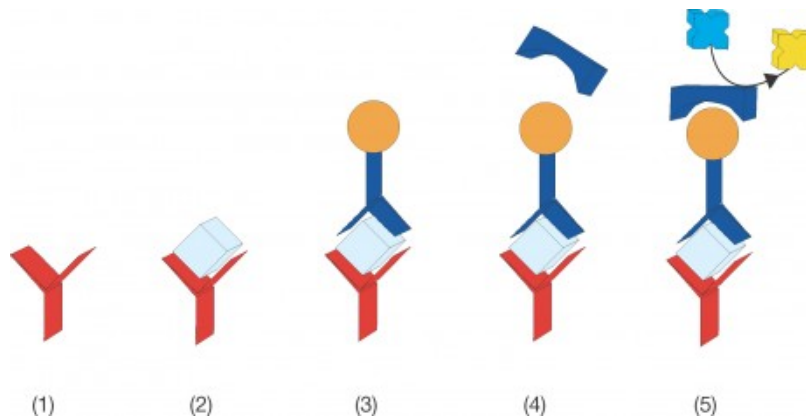


Figure 36 : Principe du test ELISA « en sandwich ». L'anticorps est fixé au fond du puits (1), l'antigène (bovSERPINA3-3 recombinante bactérienne) est ensuite ajouté et capturé par l'anticorps (2). Le même anticorps sur lequel est greffée la biotine (cercle orange) vient se fixer sur l'antigène capturé (3). Le complexe avidine-peroxydase se fixe à son tour sur la biotine (4). Enfin, la réaction colorimétrique est amorcée par l'ajout du substrat (5).

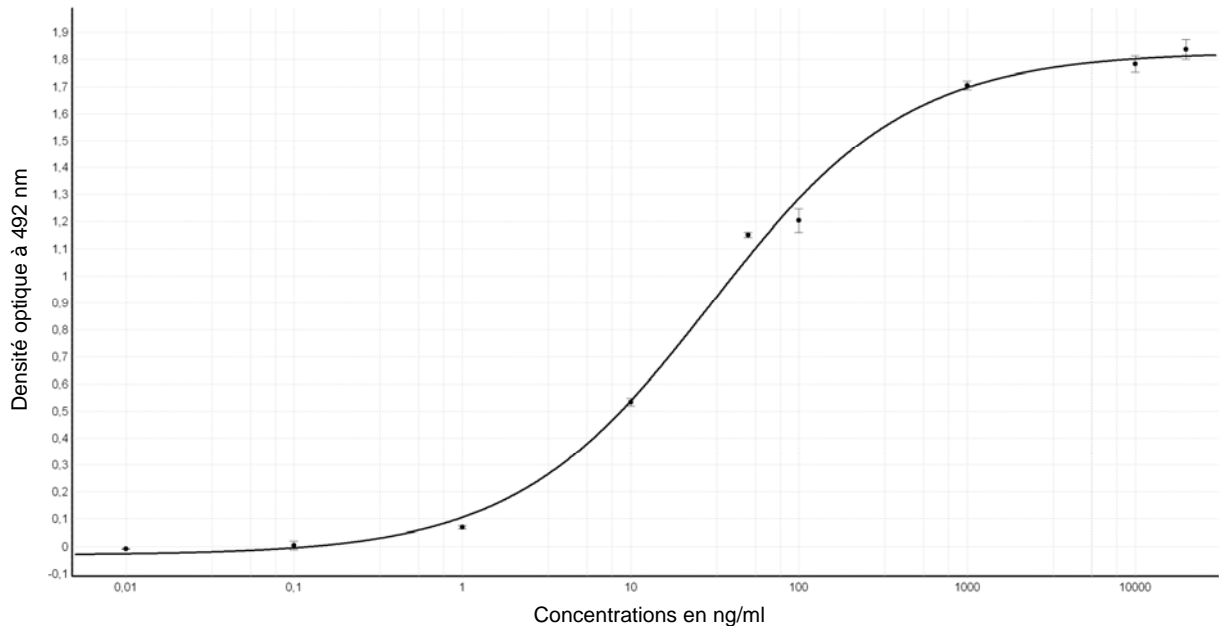


Figure 37 : Courbe de calibration de bovSERPINA3-3 obtenue par ELISA. La courbe a été réalisée à partir d'une gamme de concentration de bovSERPINA3-3 recombinante sauvage purifiée de 0,01 ng/ml à 10000 ng/ml selon la procédure décrite au paragraphe III.2. La courbe 4-paramètres obtenue a pour équation : $y = -0,032 + 1,82 / [1 + (1,478/x)^{0,74}]$ avec x la concentration en ng/ml.

III.2 Principe et mise au point du test ELISA

Parmi les différentes méthodes ELISA existantes, nous nous sommes orientés sur le test ELISA « en sandwich » (figure 36). Dans cette technique de dosage, les puits d'une microplaque sont tapissés avec un anticorps de capture, des immunoglobulines G (IgG) diluées dans du PBS et capables de lier spécifiquement l'antigène recherché. Lors de cette opération appelée « *coating* », l'anticorps de capture se fixe au plastique des puits par interaction électrostatique. L'anticorps de capture assure la spécificité du test. Une étape supplémentaire de « *surcoating* » est ensuite réalisée. Cette étape permet de saturer le puits afin d'éviter toute fixation aspécifique par l'un des composés qui sera par la suite ajouté. Elle est réalisée avec du sérum de lapin 10% dilué dans du PBST 0,1%. La solution à tester est déposée dans les puits de la microplaque. Si l'antigène recherché est présent, il se lie spécifiquement à l'anticorps de capture. La solution à tester est ici une solution de PBST 0,1% contenant du sérum de lapin 1% et la protéine recombinante bovSERPINA3-3 bactérienne à différentes concentrations. Un deuxième anticorps, l'anticorps traceur, capable de se lier à l'antigène capturé, est alors ajouté dans le puits et les anticorps traceurs non fixés sont éliminés par lavage. Dans le cas présent, il s'agit du même anticorps mais couplé à la biotine. La réaction colorimétrique s'effectue après l'ajout de la peroxydase couplée à l'avidine. L'avidine est une protéine qui peut fixer la biotine. La peroxydase, en dégradant un substrat, l'ortho-phénylènediamine (contenu dans un tampon phosphate 50 mM, citrate 25 mM et peroxyde d'hydrogène 0,015% final), permet la formation de phénylènediimine qui, après ajout de H₂SO₄ 2,5 M, absorbe à 492 nm. La densité optique sera alors lue sur un spectrophotomètre à cette longueur d'onde.

Pour valider un test ELISA, différents paramètres doivent être mesurés tels que la limite de détection, la précision (répétabilité inter- et intra-essai), le taux de recouvrement ou encore la linéarité.

III.2.1 Etablissement de la courbe de calibration

La mise au point d'un test ELISA nécessite l'établissement d'une courbe de calibration en utilisant des concentrations croissantes d'antigène. Après plusieurs essais, nous avons établi une gamme allant de 0,01 ng/ml à 10 µg/ml de la protéine bovSERPINA3-3 recombinante. La courbe de calibration correspondante est représentée figure 37. En se basant sur les premiers travaux de thèse de Herrera-Mendez (2006), nous avons utilisé l'anticorps

Tableau XIV : Coefficient de variation de la répétabilité inter- et intra-essai du dosage ELISA

		Concentration de bovSERPINA3-3 (ng/ml)			
		5	10	30	70
Intra-essai	Moyenne ± écart-type (ng/ml)	4,99 ± 0,192	9,91 ± 0,19	33,51 ± 0,209	67,56 ± 0,245
	CV (%)	3,84	1,92	0,63	0,36
	Nombre de répétitions : 10				
Inter-essai	Moyenne ± écart-type (ng/ml)	5,09 ± 0,15	9,98 ± 0,22	32,77 ± 2,68	67,22 ± 0,73
	CV (%)	2,95	2,23	8,19	1,09
	Nombre de répétitions : 3				

Tableau XV : Test de récupération d'un extrait brut de collier (*Longus colli*) dilué au 3000^{ème} avec l'anti-protéase bovSERPINA3-3

Dilution	Concentration de bovSERPINA3-3 recombinante ajoutée (ng/ml)	Concentration théorique mesurée (ng/ml)	Concentration mesurée (ng/ml)	Recouvrement (%)
		21,3	–	–
1/3000	10	31,3	30,5	97,44
	20	41,3	36	87,8
	30	51,3	50,81	99
	40	61,3	60,14	98,1

« coaté » à la concentration constante de 1 µg/ml. La courbe de calibration est semblable à celle obtenue avec l'anti-protéase purifiée à partir du muscle squelettique bovin. Il s'agit d'une sigmoïde dont la partie linéaire, importante, est située entre 5 ng/ml et 100 ng/ml. Ceci permet de conclure que l'utilisation de la protéine recombinante bactérienne est envisageable pour l'application de ce test.

III.2.2 Détermination de la limite de détection du dosage

La limite de détection correspond à la plus petite valeur d'absorbance pouvant être distinguée d'un blanc de réaction. Ce dernier est obtenu à partir de puits dans lequel seul l'antigène est absent. La détermination de ce blanc est obtenue en effectuant la moyenne et l'écart-type de 10 dosages d'une solution ne contenant pas de serpine. Dans nos expériences, l'écart-type a été multiplié par 3 et cette valeur a été ajoutée à la moyenne. Elle est reportée en ordonnée sur la courbe de calibration du dosage et permet de déterminer une concentration qui représente la limite de détection du test. Dans le cas présent, cette limite a pu être estimée à environ 0,9 ng/ml de protéine. Cette valeur est compatible avec des résultats observés dans la littérature à partir d'antigènes recombinants. Ainsi, ce test que nous avons ainsi mis au point permet donc de doser de très faibles quantités de protéines.

III.2.3. Détermination de la répétabilité inter- et intra-essai du dosage ELISA

Le pourcentage de répétabilité de variation du dosage (CV) est déterminé par la formule suivante :

$$CV = \text{écart-type/moyenne} \times 100$$

La répétabilité intra-essai est réalisée sur 10 dépôts de 4 solutions d'inhibiteur à 5, 10, 30 et 70 ng/ml. La répétabilité inter-essai a été évaluée de la même façon que pour la répétabilité intra-essai mais dans 3 expériences espacées d'une journée chacune.

Les résultats obtenus montrent des coefficients de variation faibles allant de 0,36% à 3,84% et 1,09% à 8,19% pour les répétabilités intra et inter-essai, respectivement (tableau XIV). Ceci suggère donc une bonne reproductibilité de ce test.

III.2.4 Détermination du pourcentage de récupération

Le recouvrement ou la récupération est l'aptitude d'une technique à mesurer correctement un produit pur qui a été ajouté à un échantillon que l'on veut doser. Cette détermination est réalisée par dosage des protéines bovSERPINA3s dans une dilution d'un extrait brut de collier (*Longus colli*), dont la concentration en serpinines est connue, après ajout de quantités croissantes de bovSERPINA3-3 purifiée ; ici, 10, 20, 30 et 40 ng/ml. Le pourcentage moyen de récupération indiqué dans le tableau XV est estimé à 95,6% ce qui permet de conclure que les anti-protéases bovSERPINA3s présentent le même comportement vis-à-vis de l'anticorps quand elles sont seules ou dans un milieu complexe. L'extrapolation de la courbe obtenue avec la gamme étalon nous permet donc de déterminer la concentration des serpinines bovSERPINA3s dans un milieu riche en protéines comme un extrait brut.

Les résultats préliminaires obtenus en utilisant la serpine bovSERPINA3-3 recombinante sont encourageants et concevables avec ceux obtenus par Herrera-Mendez avec la protéine musculaire. Ainsi, la protéine recombinante produite chez *E. coli* est purifiée selon un protocole bien établi, en quantité suffisante et de manière rapide ce qui ne constitue donc pas une étape limitante pour une utilisation de ce test à grande échelle. Nous pouvons, dès à présent, envisager de mettre en œuvre ce test pour quantifier les serpinines A3 bovines dans les échantillons musculaires des 60 taurillons de 15-19 mois du programme Qualvigène et qui ont été phénotypés « extrêmes » pour le caractère de tendreté. Cela permettra enfin d'établir s'il existe un lien entre la quantité de serpineA3 bovine et la tendreté de la viande. De manière plus fondamentale, ce test est utilisable pour faire une analyse protéique spatio-temporelle des serpinines A3 à différents stades de développement (de l'embryon à l'âge adulte) et dans différents organes et tissus.

Partie IV

La transformation du muscle en viande : de l'abattage de l'animal à la phase de *rigor mortis*

La génomique fonctionnelle, via des approches de transcriptomique et de protéomique, permet d'éclairer, sous un nouvel angle, des mécanismes opérant au sein de la cellule musculaire après la mort de l'animal. A partir des différentes recherches expérimentales et bibliographiques que j'ai réalisées, j'ai pu élaborer un scénario expliquant le déroulement enzymatique de différents processus survenant après la mort de l'animal. Ce scénario, hypothétique et encore incomplet, s'appuie sur un certain nombre de résultats obtenus.

Juste après la mort de l'animal, la cellule maintient, pendant quelques temps, son homéostasie. Cela se traduit par une augmentation de la synthèse de protéines et de métabolites énergétiques comme l'ATP via une stimulation de la glycolyse aérobie. Cette augmentation de l'activité de la glycolyse, du cycle de Krebs et de la β -oxydation des acides gras semble confirmée par les résultats de transcriptomique et de protéomique obtenus par différents auteurs (tableau XVI). De la même manière, certaines voies de dégradation des acides aminés pourraient également être stimulées. Ceci permettrait d'expliquer pourquoi certains produits des gènes tels que *ACAD8* et *HGD* ont été identifiés comme des gènes candidats pour la tendreté. Le gène *ACAD8* code l'acyl-Coenzyme A déshydrogénase, une enzyme impliquée dans le catabolisme de la valine et celui des acides gras. Cette enzyme est également responsable de la synthèse de $FADH_2$ qui entre dans la chaîne respiratoire mitochondriale pour permettre la synthèse d'ATP. Le gène *HGD* code, quant à lui, une enzyme impliquée dans le catabolisme de la tyrosine et de la phénylalanine, l'homogentisate 1,2-dioxygénase, qui permet la conversion de l'homogentisate en acétoacétate et fumarate, ce dernier étant un intermédiaire réactionnel du cycle de Krebs. Le détournement de toutes ces voies permet une augmentation de la synthèse de molécules d'ATP mais aussi de $NAD(P)H$ et de $FADH_2$, 2 molécules qui permettront par la suite la synthèse d'ATP via la chaîne respiratoire oxydative. Pour permettre la conversion de ces molécules, les protéines impliquées dans le fonctionnement de cette chaîne devraient se trouver fortement augmentées. De plus, ces voies métaboliques se déroulent, en grande partie, dans la mitochondrie, un organelle possédant une bicouche phospholipidique. Aussi, est-il nécessaire de permettre le transport des constituants à l'intérieur de la mitochondrie. Il est donc vraisemblable de penser que la quantité de ces transporteurs augmente elle aussi.

Tableau XVI : Liste de protéines impliquées dans le métabolisme énergétique

Nom	Fonction	Relation avec la tendreté	Référence
NADH déshydrogénase (ubiquinone) Fe-S protéine 1	Constituant du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale	Taux d'expression corrélé négativement avec la tendreté à 24 heures <i>post-mortem</i>	Kee <i>et al.</i> (2008)
NADH déshydrogénase flavoprotéine 2			
Protéine d'assemblage de la cytochrome c oxydase	Constituant du complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale		
Malate déshydrogénase	Convertit le malate en oxaloacétate, intermédiaire du cycle de Krebs		
Glutamate oxaloacétate transaminase 1	Intervient dans la catalyse de l'aspartate en oxaloacétate		
Glutamate oxaloacétate transaminase 2			
Isoforme 1 de la sous-unité C du complexe de la succinate déshydrogénase	Constituant du complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale		
Nicotinamide nucléotide transhydrogénase	Fonctionne comme une pompe à proton au travers de la membrane mitochondriale		
Phosphoglucomutase 1	Intervient dans la glycolyse	Diminution de la quantité à 24 heures <i>post-mortem</i> dans des animaux Charolais et Salers de tendreté supérieure	Bouley <i>et al.</i> (2004)
Lactate déshydrogénase B	Convertit le lactate en pyruvate	Diminution de la quantité à 24 heures <i>post-mortem</i> dans des animaux Charolais et Salers de tendreté supérieure	
Triosephosphate isomérase	Intervient dans la glycolyse	Diminution de la quantité à 24 heures <i>post-mortem</i>	Jia <i>et al.</i> (2006a)
Lactoylglutathione lyase	Intervient dans le métabolisme du pyruvate	Augmentation de la quantité à 24 heures <i>post-mortem</i>	
Aldéhyde déshydrogénase chaîne d	Intervient dans la glycolyse et produit de l'acétate	Augmentation de la quantité jusqu'à 10 heures <i>post-mortem</i>	Jia <i>et al.</i> (2007)

Tableau XVI (suite)

Enolase 1	Intervient dans la glycolyse et néoglucogénèse	Augmentation de la quantité jusqu'à 10 heures <i>post-mortem</i>	Jia <i>et al.</i> (2007)
ADP-ribosylhydrolase like 1	Catalyse la formation d'ADP-ribose à partir d'actine-ADP-ribose	Augmentation de la quantité jusqu'à 10 heures <i>post-mortem</i>	
Protéine GPD1	Permet la synthèse de glycérol-3-phosphate avec production du cofacteur NADH	Augmentation de la quantité après 10 heures <i>post-mortem</i>	
3-hydroxyisobutyrate déshydrogénase	Intervient dans le catabolisme de la valine, la leucine et l'isoleucine	Augmentation de la quantité à 1 heure <i>post-mortem</i>	Jia <i>et al.</i> (2007, 2006b)
		Augmentation de la quantité à 24 heures <i>post-mortem</i>	
Guanidinoacétate N-méthyltransférase	Catalyse la dernière étape de la synthèse de la créatine	Augmentation de la quantité après 10 heures <i>post-mortem</i>	Jia <i>et al.</i> (2007)
Adénylate kinase 1	Permet la conversion de l'AMP en ADP à partir d'ATP	Augmentation de la quantité après 24 heures <i>post-mortem</i>	
Créatine kinase M	Catalyse la formation de phosphocréatine	Associée positivement avec la force de cisaillement à 14 jours <i>post-mortem</i>	Zapata <i>et al.</i> (2009)
		Associée négativement avec la force de cisaillement à 72 heures <i>post-mortem</i>	
		Augmentation de la quantité jusqu'à 10 heures <i>post-mortem</i>	Jia <i>et al.</i> (2007)

Tableau XVI (suite)

Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase	Intervient dans la glycolyse	Associée négativement avec la force de cisaillement à 14 jours <i>post-mortem</i>	Zapata <i>et al.</i> (2009)	
ATP synthase E	Constituant du complexe V de la chaîne respiratoire mitochondriale			
ATP synthase F				
Sous-unité 5A de la cytochrome c oxydase	Constituant du complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale			
Sous-unité 7 du complexe BC ₁ du cytochrome	Constituant du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale	Associée négativement avec la force de cisaillement à 14 jours <i>post-mortem</i>		
Sous-unité α de l'ATP synthase	Constituant du complexe V de la chaîne respiratoire mitochondriale	Associée avec une plus grande amplitude d'attendrissage durant la maturation		
Sous-unité β de l'ATP synthase				
Composant du complexe 2-oxoglutarate déshydrogénase	Permet la catalyse du 2-oxoglutarate en succinyl-CoA			
Membre A1 de la famille 7 de l'aldéhyde déshydrogénase	Intervient dans la glycolyse et produit de l'acétate	Augmentation de la quantité à 1 heure <i>post-mortem</i>		Jia <i>et al.</i> (2006b)
Phosphoglycérate kinase 1	Intervient dans la glycolyse et la néoglucogénèse			
Enolase 3				
Sous-unité β du succinyl-CoA synthétase ATP-spécifique	Constituant de la succinyl-CoA synthétase intervenant dans le cycle de Krebs	Augmentation de la quantité à 1 heure <i>post-mortem</i>		Jia <i>et al.</i> (2006b)
Sous-unité α de l'isocitrate déshydrogénase 3	Constituant de l'isocitrate déshydrogénase intervenant dans le cycle de Krebs			
Protéine 2A contenant le domaine Fumarylacétoacétate hydrolase	Catalyse la formation de fumarate et d'acétoacétate lors du catabolisme de la tyrosine			
Ubiquitin-conjugating enzyme E2N	Joue un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire et la différenciation			

Par ailleurs, en fonction du type de fibres musculaires, le maintien de l'homéostasie pourrait être plus ou moins long dans le temps. Dans les fibres rapides, la production d'ATP serait moins importante que dans les fibres lentes. Dans ces dernières, l'homéostasie serait prolongée influençant la chute du pH. Ainsi, dans les muscles à fibres lentes, la production de lactate serait moins importante et la baisse du pH plus faible.

Le maintien de l'homéostasie est responsable également de la synthèse de protéines qui sont nécessaires à sa conservation. Ainsi, la cellule synthétise activement des protéines de stress et de maintien du potentiel oxydo-réducteur. Les protéines de stress, aussi appelées protéines de choc thermique ou HSP, agissent comme des protéines chaperonnes : elles assurent la bonne conformation des protéines néo-synthétisées et des protéines ayant subi une dénaturation ou un mauvais repliement, notamment en cas de stress oxydatif. La protéine de stress la plus souvent retrouvée dans les études protéomiques et dont la quantité varie est HSPB1 aussi connue sous le nom de HSP27 (Jia *et al.*, 2006a, b, 2007). Elle est également impliquée dans l'organisation de l'actine. Rappelons aussi que selon les conditions environnementales avant abattage, le stress qui en résulte peut conduire à une première augmentation de l'expression de protéines de stress. Pour maintenir le potentiel oxydo-réducteur, la cellule mobilise différentes protéines qui vont permettre de détoxifier les groupements peroxyde générés dans le milieu. Ainsi, la synthèse de protéines aux propriétés antioxydantes, telles que les peroxirédoxines 2 et 6, (cette dernière ayant été récemment décrite comme marqueur potentiel de la tendreté), la protéine SP-22 ou encore la biliverdine réductase B, augmente dans les 4 premières heures *post-mortem* (Jia *et al.*, 2006a, b, 2007). Lorsque les réserves énergétiques sont épuisées, l'homéostasie n'est plus maintenue. Ce signal déclenche la mort cellulaire programmée. Son initiation passe vraisemblablement par les voies de la mitochondrie et du réticulum endoplasmique. L'intensité de ce processus va être conditionnée par le recrutement d'inhibiteurs apoptotiques telles que certaines serpinines A3 et de protéines luttant contre le stress, comme les protéines HSP, protéines qui sont produites durant le maintien de l'homéostasie. Le déclenchement de l'apoptose amorce alors l'initiation de la transformation du muscle en viande. Différentes enzymes protéolytiques vont agir pour permettre, non seulement, la dégradation des structures myofibrillaires mais aussi celle des structures constitutives de l'architecture de la cellule musculaire comme, par exemple, les isoformes 4 et 8 de la tubuline α qui diminuent de plus de 90% après 10 heures *post-mortem* (Jia *et al.*, 2007) mais aussi les isoformes 3 et 4A de la tubuline α et les isoformes 2C et 3 de la tubuline β , dont le degré de dégradation conditionne l'amplitude de l'attendrissage du muscle durant la maturation (Zapata *et al.*, 2009).

Cette dégradation concerne également des protéines dont le taux d'expression avait augmenté initialement comme par exemple les protéines de stress et de défense. La quantité de protéine HSP27 diminue de près de 70%. C'est également le cas pour certaines enzymes métaboliques (Bouley *et al.*, 2004 ; Jia *et al.*, 2007). Avant de « s'attaquer » à leurs cibles, les protéases doivent préalablement dégrader les protéines chaperonnes mises en place pour les protéger. De plus, certaines protéases cliveraient les inhibiteurs d'autres protéases. C'est, par exemple, le cas des caspases qui dégraderaient la calpastatine, afin de « faciliter » l'action des calpaïnes (Kemp *et al.*, 2010). Pulford *et al.* (2009) ont montré que les caspases 3 et 7 possèdent encore plus de 60% d'activité après 22 heures *post-mortem*. Ainsi, les caspases effectrices restent certainement actives au-delà des 24 heures.

La chute du pH provoque également la rupture des membranes des lysosomes, ce qui permet la libération des cathepsines et rend les HSPs insolubles (Pulford *et al.*, 2008). Les cathepsines libérées, notamment les cathepsines B et L, vont agir pendant 14 jours *post-mortem*, en clivant leurs cibles, mais aussi activer les caspases et ainsi augmenter le phénomène apoptotique. Parallèlement, la perte progressive de l'homéostasie et le déclenchement de l'apoptose provoquent un arrêt de la chaîne respiratoire mitochondriale et des processus cataboliques en cours, notamment la β -oxydation des acides gras. Cela conduit à une production de plus en plus importante de radicaux d'espèces oxygénés (ROS). Ces ROS vont agir sur les pompes calciques du réticulum sarcoplasmique en inhibant l'entrée du calcium (par exemple la protéine SERCA1) ou en stimulant son relargage (comme la protéine RyR) de l'organelle. Le taux de calcium intracellulaire, en augmentant progressivement, active la calpaïne 1 qui clive à son tour la caspase 12 et augmente ainsi l'intensité du phénomène apoptotique. Les ROS interagissent également avec les constituants cellulaires et provoquer leur oxydation (Martinaud *et al.*, 1997). Cette oxydation peut être corrigée par les mécanismes anti-oxydants de la cellule. Cependant, la production de protéines oxydées aura un impact négatif sur la tendreté en diminuant l'activité des protéases, notamment celle de la calpaïne 1 (Rowe *et al.*, 2004). Par la suite, ces molécules seront dégradées par le protéasome stimulé dès l'activation des calpaïnes dans le milieu, comme cela a pu être montré par Smith et Dodd (2007) sur le muscle *diaphragma* du rat. Ces auteurs ont également remarqué que la voie de signalisation impliquant la protéine kinase B, ou Akt, était inhibée par les calpaïnes. La modulation de la signalisation intracellulaire affecterait donc la tendreté de la viande (Kee *et al.*, 2008). La matrice extracellulaire serait également sensible à la dégradation par des protéases et notamment les matrixines, bien que leur action ne soit pas encore clairement établie. Ces enzymes ne s'attaquent pas au collagène mais aux protéines qui

assurent la liaison entre la membrane sarcoplasmique et le collagène ou le tissu conjonctif de façon plus générale. Ainsi, Hnia *et al.* (2007) ont montré que, chez des souris présentant la dystrophie de Duchenne, la production de ROS stimule la voie de signalisation passant par NF- κ B et augmente ainsi la synthèse des protéines MMP 2 et 9. Ces deux protéases cliveraient ensuite la partie N-terminale du β -dystroglycane, désolidarisant la cellule musculaire de la matrice extracellulaire. De même, la thrombine viendrait déstructurer et éliminer la jonction neuromusculaire (Liu *et al.*, 1994). La thrombine n'est active qu'en présence de phosphatidyl-sérine située sur la face externe de la cellule. Elle permet le maintien à la membrane du complexe nécessaire à son activation (Boon *et al.*, 2003). La présence de ce phospholipide sur la face externe a lieu pendant la phase d'apoptose et son rôle pourrait être modulé par l'antithrombine récemment mise en évidence dans les cellules musculaires bovines (Herrera-mendez *et al.*, 2010). Il reste cependant à établir quelle(s) est (sont) les protéase(s) à sérine impliquée(s) dans la transformation du muscle en viande ainsi que leur(s) rôle(s).

La poursuite de la chute du pH va pratiquement inhiber l'action des calpaïnes à 24 heures *post-mortem* (Camou *et al.*, 2007). Seuls les autres systèmes protéasiques continueront le processus de protéolyse ménagée. Ils clivent de manière « grossière » les protéines myofibrillaires et structurales de la cellule musculaire qui sont finalement fragmentées en petits peptides dans le protéasome, dont l'action est initiée au début de l'apoptose et se prolonge au moins pendant les 7 jours suivant l'abattage.

Enfin, par une étude protéomique, Zapata *et al.* (2009) ont émis l'hypothèse d'une hyperplasie du muscle c'est-à-dire une augmentation du nombre de cellules et donc une stimulation de la myogenèse. En effet, une corrélation positive a été établie entre la force de cisaillement à 14 jours *post-mortem* et la quantité de la protéine musculaire LIM stimulatrice de la myogenèse (Kong *et al.*, 1997). Il semble possible, qu'après la mort de l'animal, le nombre de cellules musculaires augmente afin d'accroître la production de métabolites énergétiques et donc de prolonger ainsi l'homéostasie. Cependant, le fait que la protéine LIM ne soit pas identifiée avant le 14^{ème} jour *post-mortem* sous-entend peut-être un rôle différent pour cette protéine.

CONCLUSION

Les serpinines constituent le plus grand groupe d'inhibiteurs de protéases à sérine et couvrent un très large spectre de fonctions. Généralement, chez les vertébrés, les gènes codant les serpinines sont retrouvés au sein « de clusters », résultant de duplication génique (Atchley *et al.*, 2001). Ceci permet d'expliquer la conservation de l'organisation de ces gènes au sein de « ces clusters ». Ainsi, en comparant, par exemple, chez l'humain et le bovin, les « clusters » contenant les gènes *SERPINA1* et *A3*, nous notons une bonne conservation de l'organisation structurale de ces gènes tous constitués de 5 exons et 4 introns. Cependant, il est à remarquer que le gène *SERPINA3* bovin n'est pas unique ; il a subi des duplications, constituant un nouveau « cluster » de 8 gènes et 1 pseudo-gène très proches tant au niveau des séquences nucléotidiques que des séquences protéiques. Cette situation, avec la présence d'un cluster « inclus » dans un cluster, constitue une donnée unique et nouvelle qui à la fois accentue la difficulté de compréhension fonctionnelle et illustre la complexité de l'évolution des serpinines notamment chez les mammifères.

Au travers des résultats obtenus au cours de cette thèse et de l'étude bibliographique des données existantes sur les paramètres génétiques liés à la tendreté des viandes bovines, et plus particulièrement sur les données de génomique fonctionnelle, nous pouvons conclure, sans surprise, que le phénomène de maturation *post-mortem* du muscle en viande est un mécanisme très complexe durant lequel de nombreux processus se mettent en place dont l'apoptose (mort cellulaire programmée) semble être l'élément déclencheur. Ainsi, j'ai proposé un scénario expliquant l'ordre d'activation et la durée de fonctionnement des enzymes protéolytiques qui conditionneraient la transformation du muscle en viande. L'homéostasie influencerait le début du déclenchement de l'apoptose. Ce maintien de l'homéostasie est assuré pour beaucoup par la mitochondrie. Cet organe semble être un élément déterminant dans le processus *post-mortem* assurant au début le maintien de l'homéostasie puis déclenchant l'apoptose. Son intensité serait tributaire de régulateurs, comme c'est le cas dans de nombreux processus physiologiques.

L'apoptose est un mécanisme qui implique une famille de protéase à cystéine, les caspases. Un des processus régulateurs viseraient donc à moduler l'action de ces caspases, ce qui freinerait son déroulement. Parmi les inhibiteurs identifiés à ce jour, quelques protéases à sérine se sont relevées être capables d'inhiber des caspases mais uniquement de manière réversible. Dans le muscle squelettique bovin, deux serpinines ont été extraites et caractérisées biochimiquement, *bovSERPINA3-1* et *bovSERPINA3-3*. Lors de ce travail, nous avons pu montrer que *bovSERPINA3-3* et *bovSERPINA3-1* étaient capables d'inhiber la caspase-3, caspase effectrice la plus étudiée dans la littérature. Il reste maintenant à élucider plus

précisément la mécanistique d'inhibition de ces anti-protéases vis-à-vis de cette caspase-3. Le rôle des 6 autres serpinines reste également à établir, notamment en ce qui concerne l'apoptose. Contrairement à d'autres serpinines, bovSERPINA3-3 et bovSERPINA3-1 sont capables de former un complexe stable avec leur cible. Ceci conforte l'implication des serpinines musculaires lors de la transformation du muscle en viande, comme l'ont établi Zamora *et al.* (2005). De plus, par mutagenèse dirigée, j'ai pu montrer que le résidu aspartate D371 est le résidu cible de la caspase-3 chez bovSERPINA3-3 et qu'il est aussi impliqué dans le phénomène de dimérisation. En effet, à l'instar d'autres serpinines, bovSERPINA3-3 se présente sous forme dimérique en SDS-PAGE. J'ai montré que lorsque le résidu D371 est modifié en alanine, la protéine perd cette faculté. L'analyse tridimensionnelle et la réalisation d'autres mutants ont permis de montrer que ce résidu participait au maintien d'une interface qui s'opère entre deux monomères de cette anti-protéase. L'intérêt porté à l'étude de ce phénomène de dimérisation réside dans le fait que des mutations peuvent se produire sur des serpinines. Dans certains cas, chez l'Homme, une mutation fait apparaître des conformères pathogéniques amenant à la formation d'agrégats (dimères ou polymères) et ces amas entraînent un dysfonctionnement de la capacité d'inhibition conduisant à différentes serpinopathies telles que l'emphysème, la cirrhose ou la maladie d'Alzheimer. Par ailleurs, au sein de notre équipe, nous avons pu mettre en évidence que la protéine bovSERPINA3-7, bien que très proche de bovSERPINA3-3, est incapable de se dimériser en conditions dénaturantes. Nous sommes donc en présence de variants conformationnels qui sont de bons modèles pour l'étude du phénomène de polymérisation des serpinines humaines. Chez le bovin, si la mutation existe, son impact sur l'attendrissage de la viande serait également à envisager. En effet, il est possible que les conditions retrouvées *post-mortem* influence le comportement de cette anti-protéase notamment dans son activité.

Le dernier point de ma thèse a été consacré à la mise au point d'un test ELISA. Ce test a pour but de quantifier le niveau d'expression protéique des serpinines A3 dans différents échantillons d'intérêt. Les tests préliminaires réalisés avec l'anti-protéase recombinante indiquent une bonne sensibilité avec un seuil de détection voisin du microgramme de protéines par millilitre de solution et des coefficients de variation du dosage très faibles, ce qui fait de ce test un test reproductible et fiable. Des investigations sont actuellement en cours pour s'assurer que les mesures réalisées sur des échantillons congelés sont corrélables à celles réalisées sur des échantillons frais. Ce test est aujourd'hui directement utilisable pour la quantification des serpinines A3s dans des échantillons d'intérêt. Ces tests permettront de mettre en relation le niveau de tendreté avec la quantité de SERPINA3s bovines.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe H.** (2000) Role of histidine-related compounds as intracellular proton buffering constituents in vertebrate muscle. *Biochemistry (Moscow)*, 65(7):757-765.
- Adams C.H. and Arthaud V.H.** (1970) Objective tenderness and maturity measurements of beef steers. *Journal of Animal Science*, 30(1):40-46.
- Akaaboune M., Hantaï D., Smirnova I., Lachkar S., Kapsimali M., Verdière-Sahuqué M. and Festoff B.W.** (1998) Developmental regulation of the serpin, protease nexin I, localization during activity-dependent polyneuronal synapse elimination in mouse skeletal muscle. *The Journal of Comparative Neurology*, 397(4):572-579.
- Alarcon-Rojo A.D. and Dransfield E.** (1995) Alteration of post-mortem ageing in beef by the addition of enzyme inhibitors and activators. *Meat Science*, 41(2):163-178.
- Alexander L.J., Macneil M.D., Geary T.W., Snelling W.M., Rule D.C. and Scanga J.A.** (2007) Quantitative trait loci with additive effects on palatability and fatty acid composition of meat in a Wagyu-Limousin F2 population. *Animal Genetics*, 38(5):506-513.
- Alfnes F., Rickertsen K and Ueland O.** (2005) Experimental evidence of risk aversion in consumer markets: The case of beef tenderness. Annual meeting of American Agricultural Economics Association, July 24-27, Providence, RI 19285.
- Allingham P.G., Harper G.S., and Hunter R.A.** (1998). Effect of growth path on the tenderness of the semitendinosus muscle of Brahman-cross steers. *Meat Science*, 48(1-2):65-73.
- Alsmeyer R.H., Palmer A.Z., Koger M. and Kirk W.G.** (1958) Some genetic aspects of tenderness in beef. *Journal of Animal Science*, 17(4):1137 (Abstract).
- Annand R.R., Dahlen J.R., Sprecher C.A., De Dreu P., Foster D.C., Mankovich J.A., Talanian R.V., Kisiel W. and Giegel D.A.** (1999) Caspase-1 (interleukin-1beta-converting enzyme) is inhibited by the human serpin analogue proteinase inhibitor 9. *The Biochemical Journal*, 342(Pt 3):655-665.
- Argilés J.M., López-Soriano F.J. and Busquets S.** (2008) Apoptosis signalling is essential and precedes protein degradation in wasting skeletal muscle during catabolic conditions. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 40(9):1674-1678.
- Atchley W.R., Lokot T., Wollenberg K., Dress A. and Ragg H.** (2001) Phylogenetic analyses of amino acid variation in the serpin proteins. *Molecular Biology and Evolution*, 18(8):1502-1511.
- Bao Q. and Shi Y.** (2007) Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death and Differentiation*, 14(1):56-65.
- Barendse W.J.** DNA markers for meat tenderness. International patent application. PCT/AU02/00122. [International patent publication WO/2002/064820]. 08 février 2002.
- Barendse W., Bunch R.J., Harrison B.E. and Thomas M.B.** (2006) The *growth hormone 1* GH1:c.457C>G mutation is associated with intramuscular and rump fat distribution in a large sample of Australian feedlot cattle. *Animal Genetics*, 37(3):211-214.
- Barendse W., Harrison B.E., Hawken R.J., Ferguson D.M., Thompson J.M., Thomas M.B. and Bunch R.J.** (2007) Epistasis between calpain 1 and its inhibitor calpastatin within breeds of cattle. *Genetics*, 176(4):2601-2610.
- Barendse W., Harrison B.E., Bunch R.J. and Thomas M.B.** (2008) Variation at the Calpain 3 gene is associated with meat tenderness in zebu and composite breeds of cattle. *BMC genetics*, 9:41.
- Barham B.L., Brooks J.C., Blanton J.R. Jr., Herring A.D., Carr M.A., Kerth C.R., and Miller M.F.** (2003). Effects of growth implants on consumer perceptions of meat tenderness in beef steers. *Journal of Animal Science*, 81(12):3052-3056.

- Barkhouse K.L., Van Vleck L.D., Cundiff L.V., Koochmaraie M., Lunstra D.D. and Crouse J.D.** (1996) Prediction of breeding values for tenderness of market animals from measurements on bulls. *Journal of Animal Science*, 74(11):2612-2621.
- Barrett A.J. and Rawlings N.D.** (1995) Families and clans of serine peptidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 318(2):247-250.
- Baumeister W., Walz J., Zühl F. and Seemüller E.** (1998) The proteasome: Paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell*, 92(3):367-380.
- Beatty K., Bieth J. and Travis J.** (1980) Kinetics of association of serine proteinases with native and oxidized alpha-1-proteinase inhibitor and alpha-1-antichymotrypsin. *The Journal of Biological Chemistry*, 255(9):3931-3934.
- Beermann D.H., Hogue D.E., Fishell V.K., Aronica S., Dickson H.W. and Schricker B.R.** (1990) Exogenous human growth hormone-releasing factor and ovine somatotropin improve growth performance and composition of gain in lambs. *Journal of Animal Science*, 68(12):4122-4133.
- Behrends S.M., Miller R.K., Rouquette Jr. F.M., Randel R.D., Warrington B.G., Forbes T.D.A., Welsh T.H., Lippke H., Behrends J.M., Carstens G.E. and Holloway J.W.** (2009) Relationship of temperament, growth, carcass characteristics and tenderness in beef steers. *Meat Science*, 81(3):433-438.
- Bellinge R.H., Liberles D.A., Iaschi S.P., O'brien P.A. and Tay G.K.** (2005) Myostatin and its implications on animal breeding: a review. *Animal Genetics*, 36(1):1-6.
- Belorgey D., Hägglöf P., Karlsson-Li S. and Lomas D.A.** (2007) Protein misfolding and the serpinopathies. *Prion*, 1(1):15-20.
- Bendixen E.** (2005) The use of proteomics in meat science. *Meat Science*, 71(1):138-149.
- Berge P., Erthbjerg P., Larsen L.M., Astruc T., Vignon X. and Moller A.J.** (2001) Tenderization of beef by lactic acid injected at different times post mortem. *Meat Science*, 57(4):347-357.
- Bernard C., Cassard-Malek I. and Hocquette F.** Genomic Marker for Meat Tenderness. International patent application PCT/EP2007/059585. [International patent application WO/2008/031846]. 09 décembre 2007.
- Bernard C., Cassar-Malek I., Le Cunff M., Dubroeuq H., Renand G. and Hocquette J.F.** (2007) New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13):5229-5237.
- Berri M., Rouchon P., Zabari M. and Ouali A.** (1998) Purification and characterization of a new potential in vivo inhibitor of cathepsin L from bovine skeletal muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 119(2):283-288.
- Bige L., Ouali A. and Valin C.** (1985) Purification and characterization of a low molecular weight cysteine proteinase inhibitor from bovine muscle. *Biochimica et Biophysica Acta*, 843(3):269-275.
- Bickerstaffe R., Hickford J.G.H., Gately K. and Zhou H.** (2008) Association of polymorphic variations in calpastatin with meat tenderness and yield of retail meat cuts in lambs. 54th International Congress of Meat Science and Technology, Cape Town, South Africa, p. 1-3.
- Bird C.H., Sutton V.R., Sun J., Hirst C.E., Novak A., Kumar S., Trapani J.A. and Bird P.I.** (1998) Selective regulation of apoptosis: the cytotoxic lymphocyte serpin proteinase inhibitor 9 protects against granzyme B-mediated apoptosis without perturbing the Fas cell death pathway. *Journal of Molecular Cell Biology*, 18(11):6387-6398.
- Birkedal-Hansen H., Moore W.G., Bodden M.K., Windsor L.J., Birkedal-Hansen B., DeCarlo A. and Engler J.A.** (1993) Matrix metalloproteinases: a review. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 4(2):197-250.

- Birkedal-Hansen H., Yamada S., Windsor J., Poulsen A.H., Lyons G., Stetler-Stevenson W. and Birkedal-Hansen B.** (2003) Matrix metalloproteinases. *Current protocols in cell biology*, Chapter 10:Unit 10.8.
- Bishop M.D., Koochmaraie M., Killefer J. and Kappes S.** (1993) Rapid communication: restriction fragment length polymorphisms in the bovine *calpastatin* gene. *Journal of Animal Science*, 71(8):2277.
- Blache D., Celi P., Blackberrv M.A., Dynes R.A. and Martin G.B.** (2000) Decrease in voluntary feed intake and pulsatile luteinizing hormone secretion after intracerebroventricular infusion of recombinant bovine leptin in mature male sheep. *Reproduction, Fertility and Development*, 12(7-8):373-381.
- Bobek L.A. and Levine M.J.** (1992) Cystatins—inhibitors of cysteine proteinases. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 3(4):307-32. Erratum in: *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 4(2):251.
- Boccard R., Buchter L., Casteels E., Cosentino E., Dransfield E., Hood D.E., Joseph R.L., MacDougall D.B., Rhodes D.N., Schön I., Tinbergen B.J. and Touraille C.** (1981) Procedures for measuring meat quality characteristics in beef production experiments. Report of a working group in the commission of the European communities' (CEC) beef production research programme. *Livestock Production Science*, 8(5):385-397.
- Boldyrev A.A. and Severin S.E.** (1990) The histidine-containing dipeptides, carnosine and anserine: distribution, properties and biological significance. *Advances in Enzyme Regulation* 30:175-188.
- Boleman S.J., Boleman S.L., Miller R.K., Taylor J.F., Cross H.R., Wheeler T.L., Koochmaraie M., Shackelford S.D., Miller M.F., West R.L., Johnson D.D. and Savell J.W.** (1997) Consumer evaluation of beef of known categories of tenderness. *Journal of Animal Science*, 75(6):1521-1524.
- Bond J.S. and Butler P.E.** (1987) Intracellular proteases. *Annual Review of Biochemistry*, 56:333-364.
- Boon J.M., Lambert T.N., Sisson A.L., Davis A.P. and Smith B.D.** (2003) Facilitated phosphatidylserine (PS) flip-flop and thrombin activation using a synthetic PS scramblase. *Journal of the American Chemical Society*, 125(27):8195-8201.
- Bouley J., Meunier B., Culioli J. and Picard B.** (2004) Analyse protéomique du muscle bovin appliquée à la recherche de marqueurs de la tendreté de la viande. 11^{ème} Rencontre Recherche Ruminants, Paris, pp 87-89.
- Bouton P.E., Harris P.V. and Shorthose W.R.** (1974) Changes in the mechanical properties of veal muscles produced by myofibrillar contraction state, cooking temperature and cooking time. *Journal of Food Science*, 39(5):869-875.
- Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium, Elsik C.G., Tellam R.L., Worley K.C. and et al.** (2009) The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. *Science*, 324(5926):522-528.
- Bozhkov P.V., Suarez M.F., Filonova L.H., Daniel G., Zamyatnin A.A. Jr, Rodriguez-Nieto S., Zhivotovsky B. and Smertenko A.** (2005) Cysteine protease mcII-Pa executes programmed cell death during plant embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(40):14463-14468.
- Brémaud L., Herrera-Mendez C.H., Coulis G., Pélissier P., Sentandreu M.A., Aubry L., Delourme D., Chambon C., Maftah A., Leveziel H. and Ouali A.** (2006) Purification of the skeletal muscle protein Endopin 1B and characterization of the genes encoding Endopin 1A and 1B isoforms. *FEBS Letters*, 580(14):3477-3484.
- Brooks J.C. and Savell J.W.** (2004) Perimysium thickness as an indicator of beef tenderness. *Meat Science*, 67(2):329-334.
- Bruce H.L., Ball R.O. and Mowat D.N.** (1991) Effects of compensatory growth on protein metabolism and meat tenderness of beef steers. *Canadian Journal of Animal Science*, 71(3):659-668.
- Buchanan F.C., Fitzsimmons C.J., Van Kessel A.G., Thue T.D., Winkelman-Sim D.C. and Schmutz S.M.** (2002) Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genetics Selection Evolution*, 34(1):105-116.

- Bump N.J., Hackett M., Hugunin M., Seshagiri S., Brady K., Chen P., Ferenz C., Franklin S., Ghayur T., Li P., Licari P., Mankovich J., Shi L., Greenberg A.H., Miller L.K. and Wong W.W.** (1995) Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science*, 269(5232):1885-1888.
- Burrow H.M., Moore S.S., Johnston D.J., Barendse W. and Bindon B.M.** (2001) Quantitative and molecular genetic influences on properties of beef: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 41(7): 893-919.
- Busch W.A., Stromer M.H., Goll D.E. and Suzuki A.** (1972) Ca²⁺-specific removal of Z lines from rabbit skeletal muscle. *Journal of Cell Biology*, 52(2):367-381.
- Caballero B., Sierra V., Oliván M., Vega-Naredo I., Tomas-Zapico C., Alvarez-Garcia O., Tolivia D., Hardeland R., Rodriguez-Colunga M.J. and Coto-Montes A.** (2007) Activity of cathepsins during beef aging related to mutations in the myostatin gene. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(2):192-199.
- Calkins C.R. and Seideman S.C.** (1988) Relationships among calcium-dependent protease, cathepsins B and H, meat tenderness and the response of muscle to aging. *Journal of Animal Science*, 66(5):1186-1193.
- Calkins C.R., Seideman S.C. and Crouse J.D.** (1987) Relationships between rate of growth, catheptic enzymes and meat palatability in young bulls. *Journal of Animal Science*, 64(5):1448-1457.
- Camou J.P., Marchello J.A., Thompson V.F., Mares S.W. and Goll D.E.** (2007) Effect of *postmortem* storage on activity of mu- and m-calpain in five bovine muscles. *Journal of Animal Science*, 85(10):2670-2681.
- Carafoli E. and Molinari M.** (1998) Calpain: a protease in search of a function? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 247(2):193-203.
- Carrell R.W. and Lomas D.A.** (2002) Alpha1-antitrypsin deficiency-a model for conformational diseases. *The New England journal of medicine*, 346(1):45-53.
- Carter M.L., McCutcheon S.N. and Purchas R.W.** (1989) Plasma metabolite and hormone concentrations as predictors of genetic merit for lean meat production in sheep: Effects of metabolic challenges and fasting. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 32:343-353.
- Casas E., Keele J.W., Shackelford S.D., Koohmaraie M., Sonstegard T.S., Smith T.P., Kappes S.M. and Stone R.T.** (1998) Association of the muscle hypertrophy locus with carcass traits in beef cattle. *Journal of Animal Science*, 76(2):468-473.
- Casas E., Shackelford S.D., Keele J.W., Stone R.T., Kappes S. M. and Koohmaraie M.** (2000) Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. *Journal of Animal Science*, 78(3):560-569.
- Casas E., Stone R.T., Keele J.W., Shackelford S.D., Kappes S. M. and Koohmaraie M.** (2001) A comprehensive search for quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternative forms of the myostatin gene. *Journal of Animal Science*, 79(4):854-860.
- Casas E., Shackelford S.D., Keele J.W., Koohmaraie M., Smith T.P.L. and Stone R.T.** (2003) Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. *Journal of Animal Science*, 81(12):2976-2983.
- Casas E., White S.N., Riley D.G., Smith T.P., Breneman R.A., Olson T.A., Johnson D.D., Coleman S.W., Bennett G.L. and Chase C.C. Jr.** (2005) Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. *Journal of Animal Science*, 83(1):13-19.
- Casas E., White S.N., Wheeler T.I., Shackelford S.D., Koohmaraie M., Rimey D.G., Chase C.C. Jr, Johnson D.D. and Smith T.P.I.** (2006) Effects of *calpastatin* and μ -*calpain* markers in beef cattle on tenderness traits. *Journal of Animal Science*, 84(3):520-525.

- Cassar-Malek I., Hocquette J.F., Jurie C., Lustrat A., Jailler R., Bauchart D., Briand Y. and Picard B.** (2004). Muscle-specific metabolic, histochemical and biochemical responses to a nutritionally induced discontinuous growth path. *Animal Science*, 79(1):49-59.
- Cauwe B., Van den Steen P.E. and Opdenakker G.** (2007) The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 42(3):113-185.
- Chandrasekaran V., Lee C.J., Lin P., Duke R.E and Pedersen L.G.** (2009) A computational modeling and molecular dynamics study of the Michaelis complex of human protein Z-dependent protease inhibitor (ZPI) and factor Xa (FXa). *Journal of Molecular Modeling*, 15(8):897-911.
- Chéret R., Delbarre-Ladrat C., de Lamballerie-Anton M. Verrez-Bagnis V.** (2007) Calpain and cathepsin activities in *post mortem* fish and meat muscles. *Food Chemistry*, 101(4):1474-1479.
- Choat W.T., Paterson J.A., Rainey B.M., King M.C., Smith G.C., Belkand K.E. and Lipsey R.J.** (2006) The effects of cattle sex on carcass characteristics and longissimus muscle palatability. *Journal of Animal Science*, 84(7):1820-1826.
- Chowdhury I., Tharakan B. and Bhat G.K.** (2008) Caspases - an update. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B. Biochemistry & Molecular Biology*, 151(1):10-27.
- Christensen S. and Sottrup-Jensen L.** (1994) Characterization of two serpins from bovine plasma and milk. *The Biochemical Journal*, 303(Pt 2):383-390.
- Christians C.J., Henrickson R.L., Morrison R.D., Chambers D. and Stephens D.F.** (1961) Some factors affecting tenderness of beef. *Journal of Animal Science*, 20(4):904 (Abstract).
- Chung H., Choi B., Jang G., Lee K., Kim H., Yoon S., Im S., Davis M. and Hines H.** (2007) Effect of variants in the ovine skeletal-muscle-specific calpain gene on body weight. *Journal of Applied Genetics*, 48(1):61-68.
- Chwieralski C.E., Welte T. and Bühling F.** (2006) Cathepsin-regulated apoptosis. *Apoptosis*, 11(2):143-149.
- Ciobanu D.C., Bastiaansen J.W., Lonergan S.M., Thomsen H., Dekkers J.C., Plastow G.S. and Rothschild M.F.** (2004) New alleles in calpastatin gene are associated with meat quality traits in pigs. *Journal of Animal Science*, 82(10):2829-2839.
- Cieślak D., Blicharski T., Kapelański W. and Pierzchala M.** (2003) Investigation of polymorphisms in the porcine myostatin (*GDF8*; *MSTN*) gene. *Czech Journal of Animal Science*, 48(2):69-75.
- Clop A., Marcq F., Takeda H., Pirottin D., Tordoir X., Bibé B., Bouix J., Caiment F., Elsen J.M., Eychenne F., Larzul C., Laville E., Meish F., Milenkovic D., Tobin J., Charlier C. and Georges M.** (2006) A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nature Genetics*, 38(7):813-818.
- Cong M., Thompson V.F., Goll D.E. and Antin P.B.** (1998) The bovine calpastatin gene promoter and a new N-terminal region of the protein are targets for cAMP-dependent protein kinase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 273(1):660-666.
- Corva P., Soria L., Schor A., Villarreal E., Cenci, Macarena P., Motter M., Mezzadra C., Melucci L., Miquel C., Paván E., Depetris G., Santini F. and Naón J.G.** (2007) Association of *CAPNI* and *CAST* gene polymorphisms with meat tenderness in *Bos taurus* beef cattle from Argentina. *Genetics and Molecular Biology*, 30(4):1064-1069.
- Costello S., O'Doherty E., Troy D.J., Ernst C.W., Kim K.-S., Stapleton P., Sweeney T. and Mullen A.M.** (2007) Association of polymorphisms in the calpain I, calpain II and growth hormone genes with tenderness in bovine *M. longissimus dorsi*. *Meat Science*, 75(4):551-557.

- Cottin P., Vidalenc P.L. and Duscastaing A.** (1981) Ca²⁺-dependent association between a Ca²⁺-activated neutral proteinase (CaANP) and its specific inhibitor. *FEBS Letters*, 136(2):221-224.
- Cover S., Cartwright T.C. and Butler O.D.** (1957) The relationship of ration and inheritance to eating quality of the meat from yearling steers. *Journal of Animal Science*, 16(4):946-956.
- Crews D.H. Jr and Franke D.E.** (1998) Heterogeneity of variances for carcass traits by percentage Brahman inheritance. *Journal of Animal Science*, 76(7):1803-1809.
- Croall D.E. and Ersfeld K.** (2007) The calpains: modular designs and functional diversity. *Genome Biology*, 8(6):218.
- Crompton M.** (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *The Biochemical Journal*, 341(Pt 2):233-249.
- Cross H.R., Carpenter Z.L. and Smith G.C.** (1973) Effects of intramuscular collagen and elastin on bovine muscle tenderness. *Journal of Food Science*, 38(6):998-1003.
- Crouse J.D., Cundiff L.V., Koch R.M., Koochmarai M. and Seideman S.C.** (1989) Comparisons of *Bos indicus* and *Bos taurus* inheritance for carcass beef characteristics and meat palatability. *Journal of Animal Science*, 67(10):2661-2668.
- Curi R.A., Chardulo L.A., Mason M.C., Arrigoni M.D., Silveira A.C. and de Oliveira H.N.** (2009) Effect of single nucleotide polymorphisms of *CAPN1* and *CAST* genes on meat traits in Nellore beef cattle (*Bos indicus*) and in their crosses with *Bos taurus*. *Animal Genetics*, 40(4):456-462.
- Dafforn T.R., Pike R.N. and Bottomley S.P.** (2004) Physical characterization of serpin conformations. *Methods*, 32(2):150-158.
- Dähl S.W., Halkier T., Lauritzen C., Dolenc I., Pedersen J., Turk V. and Turk B.** (2001) Human recombinant pro-dipeptidyl peptidase I (cathepsin C) can be activated by cathepsins L and S but not by autocatalytic processing. *Biochemistry*, 40(6):1671-1678.
- Das K.C. and Muniyappa H.** (2009) c-Jun-NH(2) terminal kinase (JNK)-mediates AP-1 activation by thioredoxin: phosphorylation of cJun, JunB, and Fra-1. *Molecular and cellular Biochemistry*, à paraître.
- Davey C.L. and K. V. Gilbert** (1969) Studies in Meat Tenderness. 7. Changes in the fine structure of meat during aging. *Journal of Food Science*, 34(1):69-74.
- Davies K.J.A.** (2001) Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie*, 83(3-4):301-310.
- Davies M.J. and Lomas D.A.** (2008) The molecular aetiology of the serpinopathies. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 40(6-7):1273-1286.
- Davis G.P., Moore S.S., Drinkwater R.D., Shorthose W.R., Loxton I.D., Barendse W. and Hetzel D.J.S.** (2008) QTL for meat tenderness in the *M. longissimus lumborum* of cattle. *Animal Genetics*, 39(1):40-45.
- de Boo H.A., Eremia S.C., Bloomfield F.H., Oliver M.H. and Harding J.E.** (2008) Treatment of intrauterine growth restriction with maternal growth hormone supplementation in sheep. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 199(5):559.e1-559.e9.
- de Oliveira Peixoto J., Facioni Guimarães S.E., Sávio Lopes P., Menck Soares M.A., Vieira Pires A., Gualberto Barbosa M.V., de Almeida Torres R. and de Almeida E Silva M.** (2006) Associations of leptin gene polymorphisms with production traits in pigs. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 123(6):378-383.
- De Koning D.J., Harlizius B., Rattink A.P., Groenen M.A.M., Brascamp, E. W. and Van Arendonk J.A.M.** (2001) Detection and characterization of quantitative trait loci for meat quality traits in pigs. *Journal of Animal Science*, 79(11):2812-2819.

- Delbarre-Ladrat C., Verrez-Bagnis V., Noël J. and Fleurence J.** (2004) Relative contribution of calpain and cathepsins to protein degradation in muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). *Food Chemistry*, 88(3):389-395.
- DeMartino G.N. and Gillette T.G.** (2007) Proteasomes: machines for all reasons. *Cell*, 129 (4):659-662.
- Denecker G., Ovaere P., Vandenaebelle P. and Declercq W.** (2008) Caspase-14 reveals its secrets. *The Journal of Cell Biology*, 180(3):451-458.
- Denoyelle C. and Lebihan E.** (2003) Intramuscular variation in beef tenderness. *Meat Science*, 66(1):241-247.
- Devine C.E., Wahlgren N.M. and Tornberg E.** (1999) Effect of rigor temperature on muscle shortening and tenderisation of restrained and unrestrained beef *m. longissimus thoracicus et lumborum*. *Meat Science*, 51(1):61-72.
- Dikeman M.E.** (2007) Effects of metabolic modifiers on carcass traits and meat quality. *Meat Science*, 77(1):121-135.
- Dikeman M.E., Pollak E.J., Zhang Z., Moser D.W., Gill C.A. and Dressler E.A.** (2005) Phenotypic ranges and relationships among carcass and meat palatability traits for fourteen cattle breeds, and heritabilities and expected progeny differences for Warner-Bratzler shear force in three beef cattle breeds. *Journal of Animal Science*, 83(10):2461-2467.
- Dinkel C.A. and Busch D.A.** (1973) Genetic parameters among production, carcass composition and carcass quality traits of beef cattle. *Journal of Animal Science*, 36(3):832-846.
- Di Stasio L., Sartore S. and Albera A.** (2002) Lack of association of *GHI* and *POU1F1* gene variants with meat production traits in Piemontese cattle. *Animal Genetics*, 33(1):61-64.
- Di Stasio L., Brugiapaglia A., Destefanis G., Albera A. and Sartore S.** (2003) *GHI* as candidate gene for variability of meat production traits in Piemontese cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 120(5):358-361.
- Dlamini Z., Mbita Z. and Zungu M.** (2004) Genealogy, expression, and molecular mechanisms in apoptosis. *Pharmacology & Therapeutics*, 101(1):1-15.
- Dobó J., Swanson R., Salvesen G.S., Olson S.T. and Gettins P.G.** (2006) Cytokine response modifier a inhibition of initiator caspases results in covalent complex formation and dissociation of the caspase tetramer. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(50):38781-38790.
- Dolenc I., Turk B., Pungercic G., Ritonja A. and Turk V.** (1995) Oligomeric structure and substrate induced inhibition of human cathepsin C. *Journal of Biological Chemistry*, 270(37):21626-21631.
- Doumit M.E. and Koohmaraie M.** (1999) Immunoblot analysis of calpastatin degradation: evidence for cleavage by calpain in *postmortem* muscle. *Journal of Animal Science*, 77(6):1467-1473.
- Dransfield E.** (1992) Modelling *post-mortem* tenderisation—III: Role of calpain I in conditioning. *Meat Science*, 31(1):85-94.
- Dransfield E., Martin J.F., Bauchart D., Abouelkaram S., Lepetit J., Culioli J., Jurie C. and Picard B.** (2003) Meat quality and composition of three muscles from French cull cows and young bulls. *Animal Science*, 76(3):387-399.
- Drinkwater R.D., Li Y., Lenane I. Davis G.P., Shorthose R., Harrison B.E., Richardson K., Ferguson D.M., Stevenson R., Renaud J., Loxton I., Hawken R.J., Tomas M.B., Newman S., Hetzel D.J.S. and Barendse W.J.** (2006) Detecting quantitative trait loci affecting beef tenderness on bovine chromosome 7 near calpastatin and lysyl oxidase. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 46(2):159-164.
- DuBose L.E. and Cartwright T.C.** (1967) Relationships among production and carcass traits in cattle. *Journal of Animal Science*, 26(1):203(Abstract).

- Duguez S., Bartoli M. and Richard I.** (2006) Calpain 3: a key regulator of the sarcomere? *FEBS Letters*, 273(15):3427-3436.
- Dupont-Versteegden E.E.** (2006) Apoptosis in skeletal muscle and its relevance to atrophy. *World Journal of Gastroenterology*, 12(46):7463-7466.
- Dutaud D., Aubry L., Guignot F., Vignon X., Monin G. and Ouali A.** (2006b) Bovine muscle 20S proteasome. II: Contribution of the 20S proteasome to meat tenderization as revealed by an ultrastructural approach. *Meat Science*, 74(2):337-344.
- Dutaud D., Aubry L., Sentandreu M.A. and Ouali A.** (2006a) Bovine muscle 20S proteasome: I. Simple purification procedure and enzymatic characterization in relation with *postmortem* conditions. *Meat Science*, 74(2):327-336.
- Dufey P.A.** (2006). Durée de finition de boeufs après estivage et qualité de la viande. *Revue Suisse d'Agriculture*, 38(6):296-302.
- Ekeowa U.I., Goptu B., Belorgey D., Hägglöf P., Karlsson-Li S., Miranda E., Pérez J., MacLeod I., Kroger H., Marciniak S.J., Crowther D.C. and Lomas D.A.** (2009) alpha1-Antitrypsin deficiency, chronic obstructive pulmonary disease and the serpinopathies. *Clinical science (London)*, 116(12):837-850.
- Elzo M.A., West R.L., Johnson D.D. and Wakeman D.L.** (1998) Genetic variation and prediction of additive and non additive genetic effects for six carcass traits in an Angus-Brahman multibreed herd. *Journal of Animal Science*, 76(7):1810-1823.
- Ertbjerg P., Henckel P., Karlsson A., Larsen L.M. and Møller A.J.** (1999) Combined effect of epinephrine and exercise on calpain/calpastatin and cathepsin B and L activity in porcine longissimus muscle. *Journal of Animal Science*, 77(9):2428-2436.
- Etherton T.D.** (2000) The biology of somatotropin in adipose tissue growth and nutrient partitioning. *Journal of Nutrition*, 130(11):2623-2625.
- Everts-van der Wind A., Larkin D.M., Green C.A., Elliott J.S., Olmstead C.A., Womack J.E. and Lewin H.A.** (2005) A high-resolution whole-genome cattle-human comparative map reveals new details of mammalian chromosome evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(51):18526-18531.
- Failla S., Juárez M., Vincenti F., Ballico S., Mormile M. and González S.F.** (2008) Changes in meat quality characteristics of two beef muscles during ageing. II: tenderness and myofibrillar degradation. 54th International Congress of Meat Science and Technology, Cape Town, South Africa.
- Falaki M., Gengler N., Sneyers M., Prandi A., Massart S., Formigoni A., Burny A., Portetelle D. and Renaville R.** (1996) Relationships of polymorphisms for growth hormone and growth hormone receptor genes with milk production traits for Italian Holstein-Friesian bulls. *Journal of Dairy Science*, 79(8):1446-1453.
- Faustman C., Cassens R.G., Schaefer D.M., Buege D.R., Williams S.N. and Scheller K.K.** (1989) Improvement of pigment and lipid stability in Holstein steer beef by dietary supplementation with vitamin E. *Journal of Food Science*, 54(4):858-862.
- French P., O'Riordan E.G., Monahan F.J., Caffrey P.J., Vidal M., Mooney M.T., Troy D.J. and Moloney A.P.** (2000). Meat quality of steers finished on autumn grass, grass silage or concentrate-based diets. *Meat Science*, 56(2):173-180.
- García-Garrido J.A., Quiles-Zafra R., Tapiador J. and Luque de Castro M.D.** (2000) Activity of cathepsin B, D, H and L in Spanish dry-cured ham of normal and defective texture. *Meat Science*, 56(1):1-6.
- Garssen G.J., Geesink G.H., Hoving-Bolink A.H. and Verplanke J.C.** (1995) Effects of dietary clenbuterol and salbutamol on meat quality in veal calves. *Meat Science*, 40(3):337-350.
- Geary T.W., McFadin E.L., MacNeil M.D., Grings E.E., Short R.E., Funston R.N. and Keisler D.H.** (2003) Leptin as a predictor of carcass composition in beef cattle. *Journal of Animal Science*, 81(1):1-8.

- Geesink G.H. and Koohmaraie M.** (1999a) *Postmortem* proteolysis and calpain/calpastatin activity in callipyge and normal lamb biceps femoris during extended *postmortem* storage. *Journal of Animal Science*, 77(6):1490-1501.
- Geesink G.H. and Koohmaraie M.** (1999b) Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by mu-calpain under *postmortem* conditions. *Journal of Animal Science*, 77(10):2685-2692.
- Geesink G.H., Taylor R.G. and Koohmaraie M.** (2005) Calpain 3/p94 is not involved in *postmortem* proteolysis. *Journal of Animal Science*, 83(7):1646-1652.
- Geesink G.H., Kuchay S., Chishti A.H. and Koohmaraie M.** (2006) Micro-calpain is essential for *postmortem* proteolysis of muscle proteins. *Journal of Animal Science*, 84(10):2834-2840.
- Gemmill T.R. and Trimble R.B.** (1999) Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1426(2):227-237.
- Gerrard D.E., Jones S.J., Aberle E.D., Lemenager R.P., Diekman M.A. and Judge M.D.** (1987) Collagen stability, testosterone and meat tenderness in growing bulls and steers. *Journal of Animal Science*, 65(5):1236-1242.
- Gettins P.G.** (2002a) Serpin structure, mechanism, and function. *Chemical reviews*, 102(12):4751-4804.
- Gettins P.G.** (2002b) The F-helix of serpins plays an essential, active role in the proteinase inhibition mechanism. *FEBS Letters*, 523(1-3):2-6.
- Gil M., Hortos M. and Sarraga C.** (1998) Calpain and cathepsin activities, and protein extractability during ageing of *longissimus* porcine muscle from normal and PSE meat. *Food Chemistry*, 63(3):385-390.
- Gill J.L., Bishop S.C., McCorquodale C., Williams J.L. and Wiener P.** (2009) Associations between the 11-bp deletion in the myostatin gene and carcass quality in Angus-sired cattle. *Animal Genetics*, 40(1):97-100.
- Godiksen H., Morzel M., Hyldig G. and Jessen F.** (2009) Contribution of cathepsins B, L and D to muscle protein profiles correlated with texture in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Chemistry*, 113(4):889-896.
- Goll D.E., Thompson V.F., Li H., Wei W. and Cong J.** (2003) The calpain system. *Physiological Reviews*, 83(3):731-801.
- Goll D.E., Netti G., Mares S.W. and Thompson V.F.** (2008) Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. *Journal of Animal Science*, 86(14 Suppl):E19-35.
- Gomis-Rüth F.X., Maskos K., Betz M., Bergner A., Huber R., Suzuki K., Yoshida N., Nagase H., Brew K., Bourenkov G.P., Bartunik H. and Bode W.** (1997) Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature*, 389(6646):77-81.
- Gooptu B. and Lomas D.A.** (2009) Conformational pathology of the serpins: themes, variations, and therapeutic strategies. *Annual review of biochemistry*, 78:147-176.
- Gooptu B., Hazes B., Chang W.S., Dafforn T.R., Carrell R.W., Read R.J. and Lomas D.A.** (2000) Inactive conformation of the serpin alpha(1)-antichymotrypsin indicates two-stage insertion of the reactive loop: implications for inhibitory function and conformational disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(1):67-72.
- Gootwine E., Sise J.A., Penty J.M. and Montgomery G.W.** (1993) The duplicated gene copy of the ovine growth hormone gene contains a *PvuII* polymorphism in the second intron. *Animal Genetics*, 24(4):319-321.
- Gorocica-Buenfil M.A. and Loerch S.C.** (2005) Effect of cattle age, forage level, and corn processing on diet digestibility and feedlot performance. *Journal of Animal Science*, 83(3):705-714.

- Gregory K.E., Cundiff L.V., Koch R.M., Dikeman M.E. and Koochmarai M.** (1994) Breed effects, retained heterosis, and estimates of genetic and phenotypic parameters for carcass and meat traits of beef cattle. *Journal of Animal Science*, 72(5):1174-1183.
- Gregory K.E., Cundiff L.V. and Koch R.M.** (1995) Genetic and phenotypic (co)variances for growth and carcass traits of purebred and composite populations of beef cattle. *Journal of Animal Science*, 73(7):1920-1926.
- Grobet L., Martin L.J., Poncelet D., Pirottin D., Brouwers B., Riquet J., Schoeberlein A., Dunner S., Ménissier F., Massabanda J., Fries R., Hanset R. and Georges M.** (1997) A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. *Nature Genetics*, 17(1):71-74.
- Gu Z., Gomez-Raya L., Våge D.I., Elo K., Barendse W., Davis G., Grosz M., Erhardt G., Kalm E., Reinsch N., Kappes S.M., Stone R.T., Davis S.K., Taylor J.F. and Kirkpatrick B.W.** (2000) Consensus and comprehensive linkage maps of bovine chromosome 7. *Animal Genetics*, 31(3):206-209.
- Gu Z.L., Zhang H.F., Zhu D.H. and Li H.** (2002) Single nucleotide polymorphism analysis of the chicken *Myostatin* gene in different chicken lines. *Acta genetica Sinica*, 29(7):599-606.
- Guimaraes S.E.F., Stahl C.H., Lonergan S.M., Geiger B. and Rothschild M.F.** (2007) Myostatin promoter analysis and expression pattern in pigs. *Livestock Science*, 112(1-2):143-150.
- Gutiérrez-Gil B., Wiener P., Nute G.R., Burton D., Gill J.L., Wood J.D. and Williams J.L.** (2008) Detection of quantitative trait loci for meat quality traits in cattle. *Animal Genetics*, 39(1):51-61.
- Guy M.P. and Friesen P.D.** (2008) Reactive-site cleavage residues confer target specificity to baculovirus P49, a dimeric member of the P35 family of caspase inhibitors. *Journal of Virology*, 82(15):7504-7514.
- Hagen O., Solberg C. and Johnston I.A.** (2008) Activity of aspartate (cathepsin D), cysteine proteases (cathepsins B, B + L, and H), and matrix metalloproteinase (collagenase) and their influence on protein and water-holding capacity of muscle in commercially farmed atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14):5953-5959.
- Harris P.V., and Shorthose W.R.** (1988) Meat texture. In: R. A. Lawrie (Ed.) *Developments in Meat Science-4*. pp 245-286. Elsevier Applied Science Publishers, London.
- Hedstrom L.** (2002) Serine protease mechanism and specificity. *Chemical Reviews*, 102(12):4501-4524.
- Heinrich M., Neumeyer J., Jakob M., Hallas C., Tchikov V., Winoto-Morbach S., Wickel M., Schneider-Brachert W., Trauzold A., Hethke A. and Schütze S.** (2004) Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death and Differentiation*, 11(5):550-563.
- Helmerson A., von Arnold S. and Bozhkov P.V.** (2008) The level of free intracellular zinc mediates programmed cell death/cell survival decisions in plant embryos. *Plant Physiology*, 147(3):1158-1167.
- Henry B.A., Goding J.W., Alexander W.S., Tilbrook A.J., Canny B.J., Dunshea F., Rao A., Mansell A. and Clarke I.J.** (1999) Central administration of leptin to ovariectomized ewes inhibits food intake without affecting the secretion of hormones from the pituitary gland: evidence for a dissociation of effects on appetite and neuroendocrine function. *Endocrinology*, 140(3):1175-1182.
- Herrera-Mendez C.H.** Marqueurs biologiques de la qualité de la viande bovine : purification, caractérisation et quantification de trios serpines musculaires, 239 p. Thèse : Sciences des Aliments : Clermont-ferrand : 2006.
- Herrera-Mendez C.H., Becila S., Boudjellal A. and Ouali A.** (2006) Meat ageing: Reconsideration of the current concept. *Trends in Food Science & Technology*, 17(8):394-405.
- Herrera-Mendez C.H., Becila S., Blanchet X., Pelissier P., Delourme D., Coulis G., Sentandreu M.A., Boudjellal A., Bremaud L. and Ouali A.** (2009) Inhibition of human initiator caspase 8 and effector caspase 3 by cross-class inhibitory bovSERPINA3-1 and A3-3. *FEBS Letters*, 583(17):2743-2748.

- Herrera-Mendez C.H., Becila S., Coulis G., Sentandreu M.A., Aubry L. and Ouali A.** (2010) Purification and partial characterization of antithrombin III from bovine skeletal muscle and possible role of thrombin in postmortem apoptosis development and in efficiency of low voltage electrical stimulation *Food Research International*, 43(1):356-363.
- Hinds M.G., Norton R.S., Vaux D.L. and Day C.L.** (1999) Solution structure of a baculoviral inhibitor of apoptosis (IAP) repeat. *Nature Structural Biology*, 6(7):648-651.
- Hitomi J., Katayama T., Eguchi Y., Kudo T., Taniguchi M., Koyama Y., Manabe T., Yamagishi S., Bando Y., Imaizumi K., Tsujimoto Y. and Tohyama M.** (2004) Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *The Journal of Cell Biology*, 165(3):347-356.
- Hnia K., Hugon G., Rivier F., Masmoudi A., Mercier J. and Mornet D.** (2007) Modulation of p38 mitogen-activated protein kinase cascade and metalloproteinase activity in diaphragm muscle in response to free radical scavenger administration in dystrophin-deficient Mdx mice. *The American Journal of Pathology*, 170(2):633-643.
- Honikel K.O. and Hamm R.** (1978) Influence of cooling and freezing of minced pre-rigor muscle on the breakdown of ATP and glycogen. *Meat Science*, 2(3):181-188.
- Hook V.Y., Purviance R.T., Azaryan A.V., Hubbard G. and Krieger T.J.** (1993) Purification and characterization of alpha 1-antichymotrypsin-like protease inhibitor that regulates prohormone thiol protease involved in enkephalin precursor processing. *Journal of Biological Chemistry*, 268(27):20570-20577.
- Hostetler R.L., Landmann W.A., Link B.A. and Fitzhugh Jr. H.A.** (1970) Influence of carcass position during *rigor mortis* on tenderness of beef muscles: Comparison of two Treatments. *Journal of Animal Science*, 31(1):47-50.
- Houbak M.B., Ertbjerg P. and Therkildsen M.** (2008) *In vitro* study to evaluate the degradation of bovine muscle proteins post-mortem by proteasome and μ -calpain. *Meat Science*, 79(1):77-85.
- Huang M., Huang F., Xu X. and Zhou G.** (2009) Influence of caspase3 selective inhibitor on proteolysis of chicken skeletal muscle proteins during post mortem aging. *Meat Science*, 115(1):181-186.
- Huff-Lonergan E., Mitsuhashi T., Beekman D.D., Parrish F.C. Jr, Olson D.G. and Robson R.M.** (1996) Proteolysis of specific muscle structural proteins by μ -calpain at low pH and temperature is similar to degradation in *postmortem* bovine muscle. *Journal of Animal Science*, 74(5):993-1008.
- Huntington J.A., Read R.J. and Carrell R.W.** (2000) Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature*, 407(6806):923-926.
- Hwang S.R., Steineckert B., Yasothornsrikul S., Sei C.A., Toneff T., Rattan J. and Hook V.Y.** (1999) Molecular cloning of endopin 1, a novel serpin localized to neurosecretory vesicles of chromaffin cells. Inhibition of basic residue-cleaving proteases by endopin 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(48):34164-34173.
- Hwang S.R., Steineckert B., Toneff T., Bunday R., Logvinova A.V., Goldsmith P. and Hook V.Y.** (2002) The novel serpin endopin 2 demonstrates cross-class inhibition of papain and elastase: localization of endopin 2 to regulated secretory vesicles of neuroendocrine chromaffin cells. *Biochemistry*, 41(33):10397-10405.
- Ibrahim R.M., Goll D.E., Marchello J.A., Duff G.C., Thompson V.F., Mares S.W. and Ahmad H.A.** (2008) Effect of two dietary concentrate levels on tenderness, calpain and calpastatin activities, and carcass merit in Waguli and Brahman steers. *Journal of Animal Science*, 86(6):1426-1433.
- Ilian M.A., Morton J.D., Kent M.P., Le Couteur C.E., Hickford J., Cowley R. and Bickerstaffe R.** (2001) Intermuscular variation in tenderness: association with the ubiquitous and muscle-specific calpains. *Journal of Animal Science*, 79(1):122-132.
- Ilian M.A., Bekhit A.E.-D. and Bickerstaffe R.** (2004a) The relationship between meat tenderization, myofibril fragmentation and autolysis of calpain 3 during post-mortem aging. *Meat Science*, 66(2):387-397.

- Ilian M.A., Bekhit A.E.-D., Stevenson B., Morton J.D., Isherwood P. and Bickerstaffe R.** (2004b) Up- and down -regulation of *longissimus* tenderness parallels changes in the myofibril-bound calpain 3 protein. *Meat Science*, 67(3):433-445.
- Im H., Ahn H.Y. and Yu M.H.** (2000) Bypassing the kinetic trap of serpin protein folding by loop extension. *Protein Science*, 9(8):1497-1502.
- Irurueta M., Cadoppi A., Langman L., Grigioni G. and Carduza F.** (2008) Effect of aging on the characteristics of meat from water buffalo grown in the Delta del Paraná region of Argentina. *Meat Science*, 79(3):529-533.
- Irving J.A., Pike R.N., Lesk A.M. and Whisstock J.C.** (2000) Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome research*, 10(12):1845-1864.
- Irving J.A., Shushanov S.S., Pike R.N., Popova E.Y., Brömme D., Coetzer T.H., Bottomley S.P., Boulyenko I.A., Grigoryev S.A. and Whisstock J.C.** (2002) Inhibitory activity of a heterochromatin-associated serpin (MENT) against papain-like cysteine proteinases affects chromatin structure and blocks cell proliferation. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(15):13192-13201.
- Ishiura S., Sano M., Kamakura K. and Sugita H.** (1985) Isolation of two forms of the high-molecular-mass serine protease, ingensin, from porcine skeletal muscle. *FEBS Letters*, 189(1):119-123.
- Janciauskiene S.** (2001) Conformational properties of serine proteinase inhibitors (serpins) confer multiple pathophysiological roles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1535(3):221-235.
- Jeacocke R.E.** (1984). The kinetics of rigor onset in beef muscle fibres. *Meat Science*, 11(4):237-251.
- Jeleniková J., Pipek P. and Staruck L.** (2008) The influence of ante-mortem treatment on relationship between pH and tenderness of beef. *Meat Science*, 80(3):870-874.
- Jeong S.Y. and Seol D.W.** (2008) The role of mitochondria in apoptosis. *BMB reports*, 41(1):11-22.
- Jeremiah L.E., Dugan M.E.R., Aalhus J.L. and Gibson L.L.** (2003) Assessment of the relationship between chemical components and palatability of major beef muscles and muscle groups. *Meat Science*, 65(3):1013-1019.
- Ji J.-R. and Takahashi K.** (2006) Changes in concentration of sarcoplasmic free calcium during post-mortem ageing of meat. *Meat Science*, 73(3):395-403.
- Jia X., Ekman M., Grove H., Faergestad E.M., Aass L., Hildrum K.I. and Hollung K.** (2007) Proteome changes in bovine longissimus thoracis muscle during the early postmortem storage period. *Journal of Proteome Research*, 6(7):2720-2731.
- Jia X., Hildrum K.I., Westad F., Kummen E., Aass L. and Hollung K.** (2006a) Changes in enzymes associated with energy metabolism during the early post mortem period in longissimus thoracis bovine muscle analyzed by proteomics. *Journal of Proteome Research*, 5(7):1763-1769.
- Jia X., Hollung K., Therkildsen M., Hildrum K.I. and Bendixen E.** (2006b) Proteome analysis of early post-mortem changes in two bovine muscle types: *M. longissimus dorsi* and *M. semitendinosus*. *Proteomics*, 6(3):936-944.
- Johnson M.H., Calkins C.R., Huffman R.D., Johnson D.D. and Hargrove D.D.** (1990) Differences in cathepsin B + L and calcium-dependent protease activities among breed type and their relationship to beef tenderness. *Journal of Animal Science*, 68(8):2371-2379.
- Johnson P.L., McEwan J.C., Dodds K.G., Purchas R.W. and Blair H.T.** (2005a) A directed search in the region of GDF8 for quantitative trait loci affecting carcass traits in Texel sheep. *Journal of Animal Science*, 83(9):1988-2000.

- Johnson P.L., McEwan J.C., Dodds K.G., Purchas R.W. and Blair H.T.** (2005b) Meat quality traits were unaffected by a quantitative trait locus affecting leg composition traits in Texel sheep. *Journal of Animal Science*, 83(12):2729-2735.
- Johnston D.J., Reverter A., Ferguson D.M., Thompson J.M. and Burrow H.M.** (2003) Genetic and phenotypic characterization of animal, carcass, and meat quality traits from temperate and tropically adapted beef breeds. 3. Meat quality traits. *Australian Journal of Agricultural Research*, 54(2):135-147.
- Jones S.J., Starkey D.L., Calkins C.R. and Crouse J.D.** (1990). Myofibrillar protein turnover in feed-restricted and realimented beef cattle. *Journal of Animal Science*, 68(9): 2707-2715.
- Jones D.T., Taylor W.R. and Thornton J.M.** (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer applications in the biosciences*, 8(3):275-282.
- Joseph R.L. and Connolly J.** (1977) The effects of suspension method, chilling rates and *postmortem* ageing period on beef quality. *Journal of Food Technology*, 12:231-247.
- Jurie C., Picard B., Hocquette J.-F., Dransfield E., Micol D. and Listrat A.** (2007) Muscle and meat quality characteristics of Holstein and Salers cull cows. *Meat Science*, 77(4): 459-466.
- Kambadur R., Sharma M., Smith T.P.L. and Bass J.J.** (1997) Mutations in *myostatin* (*GDF8*) in Double-Muscling Belgian Blue and Piedmontese Cattle. *Genome Research*, 7(9): 910-915.
- Kee H.J., Park E.W. and Lee C.K.** (2008) Characterization of beef transcripts correlated with tenderness and moisture. *Molecules and Cells*, 25(3):428-437.
- Keele J.W., Shackelford S.D., Kappes S.M., Koohmaraie M. and Stone R.T.** (1999) A region on bovine chromosome 15 influences beef longissimus tenderness in steers. *Journal of Animal Science*, 77(6):1364-1371.
- Kemp C.M., Bardsley R.G. and Parr T.** (2006) Changes in caspase activity during the *postmortem* conditioning period and its relationship to shear force in porcine longissimus muscle. *Journal of Animal Science*, 84(10):2841-2846.
- Kemp C.M., Sensky P.L., Bardsley R.G., Buttery P.J. and Parr T.** (2010) Tenderness-An enzymatic view. *Meat Science*, 84(2):248-256.
- Kennes Y.M., Murphy B.D., Pothier F. and Palin M.F.** (2001) Characterization of swine *leptin* (*LEP*) polymorphisms and their association with production traits. *Animal Genetics*, 32(4):215-218.
- Kent M.P., Spencer M.J. and Koohmaraie M.** (2004) *Postmortem* proteolysis is reduced in transgenic mice overexpressing calpastatin. *Journal of Animal Science*, 82(3):794-801.
- Kieffer N.M., Hendrickson R.L., Chambers D. and Stephens D.F.** (1958) The influence of sire upon some carcass characteristics of Angus steers and heifers. *Journal of Animal Science*, 17(4):1137 (Abstract).
- Kim M., Park S.Y., Pai H.S., Kim T.H., Billiar T.R. and Seol D.W.** (2004) Hypoxia inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by blocking Bax translocation. *Cancer Research*, 64(12):4078-4081.
- Kim N.K., Cho S., Lee S.H., Park H.R., Lee C.S., Cho Y.M., Choy Y.H., Yoon D., Im S.K. and Park E.W.** (2008) Proteins in *longissimus* muscle of Korean native cattle and their relationship to meat quality. *Meat Science*, 80(4):1068-1073.
- King D.A., Dikeman M.E., Wheeler T.L., Kastner C.L. and Koohmaraie M.** (2003) Chilling and cooking rate effects on some myofibrillar determinants of tenderness of beef. *Journal of Animal Science*, 81(6):1473-1481.
- King D.A., Schuehle Pfeiffer C.E., Randel R.D., Welsh Jr. T.H., Oliphint R.A., Baird B.E., Curley Jr. K.O., Vann R.C., Hale D.S. and Savell J.W.** (2006) Influence of animal temperament and stress responsiveness on the carcass quality and beef tenderness of feedlot cattle. *Meat Science*, 74(3):546-556.

- Knorr C., Moser G., Müller E. and Geldermann H.** (1997) Associations of GH gene variants with performance traits in F2 generations of European wild boar, Piétrain and Meishan pigs. *Animal Genetics*, 28(2):124-128.
- Koch R.M., Cundiff L.V. and Gregory K.E.** (1982) Heritabilities and genetic, environmental and phenotypic correlations of carcass traits in a population of diverse biological types and their implications in selection programs. *Journal of Animal Science*, 55(6):1319-1329.
- Kong Y., Flick M.J., Kudla A.J. and Konieczny S.F.** (1997) Muscle LIM protein promotes myogenesis by enhancing the activity of MyoD. *Molecular and cellular biology*, 17(8):4750-4760.
- Koohmaraie M.** (1990) Quantification of Ca²⁺-dependent protease activities by hydrophobic and ion-exchange chromatography. *Journal of Animal Science*, 68(3):659-665.
- Koohmaraie M.** (1992a) The role of Ca(2+)-dependent proteases (calpains) in post mortem proteolysis and meat tenderness. *Biochimie*, 74(3):239-245.
- Koohmaraie M.** (1992b) Ovine skeletal muscle multicatalytic proteinase complex (proteasome): purification, characterization, and comparison of its effects on myofibrils with mu-calpains. *Journal of Animal Science*, 70(12):3697-3708.
- Koohmaraie M., Crouse J.D. and Mersmann H.J.** (1989) Acceleration of *postmortem* tenderization in ovine carcasses through infusion of calcium chloride: effect of concentration and ionic strength. *Journal of Animal Science*, 67(4):934-942.
- Koohmaraie M., Whipple G., Kretchmar D.H., Crouse J.D. and Mersmann H.J.** (1991a) *Postmortem* proteolysis in longissimus muscle from beef, lamb and pork carcasses. *Journal of Animal Science*, 69(2):617-624.
- Koohmaraie M., Shackelford S.D., Muggli-Cockett N.E. and Stone R.T.** (1991b) Effect of the beta-adrenergic agonist L644,969 on muscle growth, endogenous proteinase activities, and *postmortem* proteolysis in wether lambs. *Journal of Animal Science*, 69(12):4823-4835.
- Koohmaraie M., Shackelford S.D., Wheeler T.L., Lonergan S.M. and Doumit M.E.** (1995) A muscle hypertrophy condition in lamb (callipyge): characterization of effects on muscle growth and meat quality traits. *Journal of Animal Science*, 73(12):3596-3607.
- Koohmaraie M., Kent M.P., Shackelford S.D., Veiseth E. and Wheeler T.L.** (2002). Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? *Meat Science*, 62(3):345-352.
- Kopp J. and Bonnet M.** (1982) Dureté de la viande et résistance au cisaillement des fibres de collagène. *Sciences des Aliments*, 2:127-132.
- Kretchmar D.H., Hathaway M.R., Epley R.J. and Dayton W.R.** (1990) Alterations in *postmortem* degradation of myofibrillar proteins in muscle of lambs fed a beta-adrenergic agonist. *Journal of Animal Science*, 68(6):1760-1772.
- Kruk Z.A., Bottema C.D.K., Davis J.J., Siebert B.D., Harper G.S., Di J. and Pitchford W.S.** (2008) Effects of vitamin A on growth performance and carcass quality in steers. *Livestock Science*, 119(1-3):12-21.
- Kumar S.** (2007) Caspase function in programmed cell death. *Cell Death and Differentiation*, 14(1):32-43.
- Ladrat C., Verrez-Bagnis V., Noël J. and Fleurence J.** (2003) *In vitro* proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins of white muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*): effects of cathepsins B, D and L. *Food Chemistry*, 81(4):517-525.
- Lagonigro R., Wiener P., Pilla F., Woolliams J.A. and Williams J.L.** (2003) A new mutation in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. *Animal Genetics*, 34(5):371-374.

- Lamare M., Taylor R.G., Farout L., Briand Y. and Briand M.** (2002) Changes in proteasome activity during *postmortem* aging of bovine muscle. *Meat Science*, 61(2):199-204.
- Lang P.A., Kempe D.S., Tanneur V., Eisele K., Klarl B.A., Myssina S., Jendrossek V., Ishii S., Shimizu T., Waidmann M., Hessler G., Huber S.M., Lang F. and Wieder T.** (2005) Stimulation of erythrocyte ceramide formation by platelet-activating factor. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 6):1233-1243.
- Lannan E., Vandergaast R. and Friesen P.D.** (2007) Baculovirus caspase inhibitors P49 and P35 block virus-induced apoptosis downstream of effector caspase DrICE activation in *Drosophila melanogaster* cells. *Journal of Virology*, 81(17):9319-9330.
- Larsen N.J., Kenealy S., Tuggle C.K. and Rothschild M.F.** (1998) A *HincII* polymorphism in the porcine calpain, large polypeptide L3 (*CAPN3*) gene. *Journal of Animal Science*, 76(3):918-919.
- Laville E., Bouix J., Sayd T., Bibé B., Elsen J.M., Larzul C., Eychenne F., Marcq F. and Georges M.** (2004) Effects of a quantitative trait locus for muscle hypertrophy from Belgian Texel sheep on carcass conformation and muscularity. *Journal of Animal Science*, 82(11):3128-3137.
- Lawrence T.E., King D.A., Obuz E., Yancey E.J. and Dikeman M.E.** (2001) Evaluation of electric belt grill, forced-air convection oven, and electric broiler cookery methods for beef tenderness research. *Meat Science*, 58(3):239-246.
- Lee Y.B. and Ashmore C.R.** (1985) Effect of early *postmortem* temperature on beef tenderness. *Journal of Animal Science*, 60(6):1588.
- Leheska J.M., Montgomery J.L., Krehbiel C.R., Yates D.A., Hutcheson J.P., Nichols W.T., Streeter M., Blanton J.R. Jr. and Miller M.F.** (2009) Dietary zilpaterol hydrochloride. II. Carcass composition and meat palatability of beef cattle *Journal of Animal Science*, 87(4):1384-1393.
- Lepetit J.** (2008) Collagen contribution to meat toughness: Theoretical aspects. *Meat Science*, 80(4):960-967.
- Lewis G.J. and Purslow P.P.** (1991) The effect of marination and cooking on the mechanical properties of intramuscular connective tissue. *Journal of Muscle Foods*, 2(3):177-195.
- Lewis G.J., Purslow P.P. and Rice A.E.** (1991) The effect of conditioning on the strength of perimysial connective tissue dissected from cooked meat. *Meat Science*, 30(1):1-12.
- Li C.B., Zhou G.H. and Xu X.L.** (2007a) Comparison of meat quality characteristics and intramuscular connective tissue between beef longissimus dorsi and semitendinosus muscles from chinese yellow bulls. *Journal of Muscle Foods*, 18(2):143-161.
- Li H., Xu S., Gao X. and Ren H.** (2007b) Structure of the bovine *ACAD8* gene and the association of its polymorphism with the production traits. *Journal of Genetics and Genomics*, 34(4):315-320.
- Li J. and Yuan J.** (2008) Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, 27(48):6194-6206.
- Li X.L., Wu Z.L., Gong Y.F., Liu Y.Q., Liu Z.Z., Wang X.J., Xin T.R. and Ji Q.** (2006) Single-nucleotide polymorphism identification in the caprine myostatin gene. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 123(2):141-144.
- Libby P. and Goldberg A.L.** (1980) Effects of chymostatin and other proteinase inhibitors on protein breakdown and proteolytic activities in muscle. *The Biochemical journal*, 188(1):213-220.
- Light N. and Champion A.E.** (1984) Characterization of muscle epimysium, perimysium and endomysium collagens. *The Biochemical Journal*, 219(3):1017-1026.
- Ligoxygakis P., Roth S. and Reichhart J.M.** (2004) A serpin regulates dorsal-ventral axis formation in the *Drosophila* embryo. *Current biology*, 13(23):2097-2102.

- Lindholm-Perry A.K., Rohrer G.A., Holl J.W., Shackelford S.D., Wheeler T.L., Koohmaraie M. and Nonneman D.** (2009) Relationships among *calpastatin* single nucleotide polymorphisms, *calpastatin* expression and tenderness in pork longissimus. *Animal Genetics*, 40(5):713-721.
- Lines D.S., Pitchford W.S., Kruk Z.A. and Bottema C.D.K.** (2009) Limousin *myostatin* F94L variant affects *semitendinosus* tenderness. *Meat Science*, 81(1):126-131.
- Listrat A., Picard B. and Geay Y.** (1999) Age-related changes and location of type I, III, IV, V and VI collagens during development of four foetal skeletal muscles of double-muscléd and normal bovine animals. *Tissue & Cell*, 31(1):17-27.
- Listrat A., Lethias C., Hocquette J.F., Renand G., Ménéssier F., Geay Y. and Picard B.** (2000) Age-related changes and location of types I, III, XII and XIV collagen during development of skeletal muscles from genetically different animals. *The Histochemical Journal*, 32(6):349-356.
- Liu Y., Fields R.D., Festoff B.W. and Nelson P.G.** (1994) Proteolytic action of thrombin is required for electrical activity-dependent synapse reduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(22):10300-10304.
- Liu Y., Qin X., Song X.Z., Jiang H., Shen Y., Durbin K.J., Lien S., Kent M.P., Sodeland M., Ren Y., Zhang L., Sodergren E., Havlak P., Worley K.C., Weinstock G.M. and Gibbs R.A.** (2009) *Bos taurus* genome assembly. *BMC Genomics*, 10(1):180.
- Locker R.H. and Hagyard C.J.** (1963). A cold shortening effect in beef muscles. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 14(11):787-793.
- Lomas D.A., Belorgey D., Mallya M., Miranda E., Kinghorn K.J., Sharp L.K., Phillips R.L., Page R., Robertson A.S. and Crowther D.C.** (2005) Molecular mousetraps and the serpinopathies. *Biochemical Society Transactions*, 33(Pt 2):321-330.
- Lomas D.A.** (2006) Parker B. Francis lectureship. Antitrypsin deficiency, the serpinopathies, and chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3(6):499-501.
- Loneragan S.M., Ernst C.W., Bishop D., Calkins C.R. and Koohmaraie M.** (1995) Relationship of restriction fragment length polymorphisms (RFLP) at the bovine *calpastatin* locus to *calpastatin* activity and meat tenderness. *Journal of Animal Science*, 73:3608-3612.
- Lorenzen C.L., Neely T.R., Miller R.K., Tatum J.D., Wise J.W., Taylor J.F., Buyck M.J., Reagan J.O. and Savell J.W.** (1999) Beef customer satisfaction: cooking method and degree of doneness effects on the top loin steak. *Journal of Animal Science*, 77(3):637-644.
- Maki M., Takano E., Osawa T., Ooi T., Murachi T. and Hatanaka M.** (1988) Analysis of structure-function relationship of pig *calpastatin* by expression of mutated cDNAs in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 263(21):10254-10261.
- Malek M., Dekkers J.C., Lee H.K., Baas T.J. and Rothschild M.F.** (2001) A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. I. Growth and body composition. *Mammalian genome*, 12(8):630-636.
- Maribo H., Ertbjerg P., Andersson M., Barton-Gade P. and Juel Møller A.** (1999) Electrical stimulation of pigs-effect on pH fall, meat quality and Cathepsin B+L activity. *Meat Science*, 52(2):179-187.
- Marques Mdo R., Santos I.C., Carolino N., Belo C.C., Renaville R. and Cravador A.** (2006) Effects of genetic polymorphisms at the growth hormone gene on milk yield in Serra da Estrela sheep. *Journal of Dairy Research*, 73(4):394-405.
- Marsh B.B.** (1993) Approaches to manipulate post-mortem metabolism and meat quality. In *Proceedings of the 39th international congress of meat science and technology*, Calgary, Canada.

- Marszal E. and Shrake A.** (2006) Serpin crystal structure and serpin polymer structure. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 453(1):123-129.
- Martinaud A., Mercier Y., Marinova P., Tassy C., Gatellier P. and Renerre M.** (1997) Comparison of oxidative processes on myofibrillar proteins from beef during maturation and by different model oxidation systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(7):2481-2487.
- Marzetti E. and Leeuwenburgh C.** (2006) Skeletal muscle apoptosis, sarcopenia and frailty at old age. *Experimental Gerontology*, 41(12):1234-1238.
- Maskos K., Lang R., Tschesche H. and Bode W.** (2007) Flexibility and variability of TIMP binding: X-ray structure of the complex between collagenase-3/MMP-13 and TIMP-2. *Journal of Molecular Biology*, 366(4):1222-1231.
- Masumoto K., Sakata Y., Arima K., Nakao I. and Izuhara K.** (2003) Inhibitory mechanism of a cross-class serpin, the squamous cell carcinoma antigen 1. *Journal of Biological Chemistry*, 278(46):45296-45304.
- Matsuishi M., Matsumoto T., Okitani A. and Kato H.** (1992) Mode of action of rabbit skeletal muscle cathepsin B towards myofibrillar proteins and the myofibrillar structure. *The International Journal of Biochemistry*, 24(12):1967-1978.
- Matsuishi M. and Okitani A.** (2003) Purification and properties of cysteine proteinase inhibitors from rabbit skeletal muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 136(2):309-316.
- Matsukura U., Okitani A., Nishimuro T. and Kato H.** (1981) Mode of degradation of myofibrillar proteins by an endogenous protease, cathepsin L. *Biochimica et Biophysica Acta*, 662(1):41-47.
- Matsumura K., Zhong D., Saito F., Arai K., Adachi K., Kawai H., Higuchi I., Nishino I. and Shimizu T.** (2005) Proteolysis of β -dystroglycan in muscular diseases. *Neuromuscular Disorders*, 15(5):336-341.
- Mayo O.** (2004) Interaction and quantitative trait loci. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 44(11):1135-1140.
- McPherron A.C. and Lee S.J.** (1997) Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(23):12457-12461.
- Meiners S., Ludwig A., Stangl V. and Stangl K.** (2007) Proteasome inhibitors: Poisons and remedies. *Medicinal Research Reviews*, 28(2):309-327.
- Meyers S.N., Rodriguez-Zas S.L. and Beever J.E.** (2007) Fine-mapping of a QTL influencing pork tenderness on porcine chromosome 2. *BMC Genetics*, 12(8):69.
- Miles C.A., Avery N.C., Rodin V.V. and Bailey A.J.** (2005) The increase in denaturation temperature following cross-linking of collagen is caused by dehydration of the fibres. *Journal of Molecular Biology*, 346(2):551-556.
- Miller M.F., Cross H.R., Crouse J.D., and Jenkins T.G.** (1987). Effect of feed energy intake on collagen characteristics and muscle quality of mature cows. *Meat Science*, 21(4):287-294.
- Miller R.K., Taylor J.F., Sanders J.O., Lunt D.K., Davis S.K., Turner J.W., Savell J.W., Kallel F., Ophir J. and Lacey R.E.** (1996) Methods for improving meat tenderness. reciprocal meat conference proceedings, 49:106-113.
- Miranda E. and Lomas D.A.** (2006) Neuroserpin: a serpin to think about. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(6):709-722.
- Moldoveanu T., Gehring K. and Green D.R.** (2008) Concerted multi-pronged attack by calpastatin to occlude the catalytic cleft of heterodimeric calpains. *Nature*, 456(7220):404-408.

- Monin G.** (1991) Facteurs biologiques des qualités de la viande bovine. *INRA Productions Animales*, 4(2):151-160.
- Monsón C.S. and Sierra I.** (2004) Influence of cattle breed and ageing time on textural meat quality. *Meat Science*, 68(4):595-602.
- More O’Ferrall G.J., Joseph R.L., Tarrant P.V. and McGloughlin P.** (1989) Phenotypic and genetic parameters of carcass and meat quality traits in cattle. *Livestock Production Science*, 21(1):35-47.
- Morgan J.B.** (1997) Implant program effects on USDA beef carcass quality grade traits and meat tenderness. Proceedings of Oklahoma State University Implant Symposium, Stillwater. Pages 147-154.
- Morishima N., Nakanishi K., Takenouchi H., Shibata T. and Yasuhiko Y.** (2002) An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(37):34287-34294.
- Morris C.A., Cullen N.G., Hickey S.M., Dobbie P.M., Veenliet B.A., Manley T.R., Pitchford W.S., Kruk Z.A., Bottema C.D. and Wilson T.** (2006) Genotypic effects of *calpain 1* and *calpastatin* on the tenderness of cooked *M. longissimus dorsi* steaks from Jersey x Limousin, Angus and Hereford-cross cattle. *Animal Genetics*, 37(4):411-414.
- Morrison C.D., Daniel J.A., Holmberg B.J., Djiane J., Raver N., Gertler A. and Keisler D.H.** (2001) Central infusion of leptin into well-fed and undernourished ewe lambs: effects on feed intake and serum concentrations of growth hormone and luteinizing hormone. *Journal of Endocrinology*, 168(2):317-324.
- Morton J.D., Bickerstaffe R., Kent M.P., Dransfield E. and Keeley G.M.** (1999) Calpain–calpastatin and toughness in *M. longissimus* from electrically stimulated lamb and beef carcasses. *Meat Science*, 52(1):71-79.
- Morzel M., Terlouw C., Chambon C., Micol D. and Picard B.** (2008) Muscle proteome and meat eating qualities of *Longissimus thoracis* of “Blonde d’Aquitaine” young bulls: A central role of HSP27 isoforms. *Meat Science*, 78(3):297-304.
- Mulgrew A.T., Taggart C.C. and McElvaney N.G.** (2007) Alpha-1-antitrypsin deficiency: current concepts. *Lung*, 185(4):191-201.
- Murphy G., Houbrechts A., Cockett M.I., Williamson R.A., O’Shea M. and Docherty A.J.** (1991) The N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity. *Biochemistry*, 30(33):8097-8102. Erratum in: *Biochemistry*, 30(42):10362
- Murphy G. and Nagase H.** (2008) Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: destruction or repair? *Nature Clinical Practice. Rheumatology*, 4(3):128-135.
- Mushunje A., Evans G., Brennan S.O., Carrell R.W. and Zhou A.** (2004) Latent antithrombin and its detection, formation and turnover in the circulation. *Journal of thrombosis and haemostasis*, 2(12):2170-2177.
- Neath K.E., Del Barrio A.N., Lapitan R.M., Herrera J.R.V., Cruz L.C., Fujihara T., Muroya S., Chikuni K., Hirabayashi M. and Kanai Y.** (2007) Difference in tenderness and pH decline between water buffalo meat and beef during *postmortem* aging. *Meat Science*, 75(3):499-505.
- Neely T.R., Lorenzen C.L., Miller R.K., Tatum J.D., Wise J.W., Taylor J.F., Buyck M.J., Reagan J.O. and Savell J.W.** (1998) Beef Customer Satisfaction: role of cut, USDA quality grade, and city on in-home consumer ratings. *Journal of Animal Science*, 76(4):1027-1033.
- Neely T.R., Lorenzen C.L., Miller R.K., Tatum J.D., Wise J.W., Taylor J.F., Buyck M.J., Reagan J.O. and Savell J. W.** (1999) Beef customer satisfaction: cooking method and degree of doneness effects on the top round steak. *Journal of Animal Science*, 77(3):653-660.
- Nephawe K.A., Cundiff L.V., Dikeman M.E., Crouse J.D. and Van Vleck L.D.** (2004) Genetic relationships between sex-specific traits in beef cattle: Mature weight, weight adjusted for body condition score, height and

body condition score of cows, and carcass traits of their steer relatives. *Journal of Animal Science*, 82(3):647-653.

Ngapo T.M., Berge P., Culioli J., Dransfield E., De Smet S. and Claeys E. (2002) Perimysial collagen crosslinking and meat tenderness in Belgian Blue double-muscle cattle. *Meat Science*, 61(1):91-102.

Nielsen V.H. and Larsen N.J. (1991) Restriction fragment length polymorphisms at the growth hormone gene in pigs. *Animal Genetics*, 22(3):291-294.

Norman G.A. (1982) Effect of breed and nutrition on the productive traits of beef cattle in South-east Brazil: part 3 - meat quality, *Meat Science*, 6(2):79-96.

O'Brien M.A. and Kirby R. (2008) Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 18(6):572-585.

O'Connor S.F., Tatum J.D., Wulf D.M., Green R.D. and Smith G.C. (1997) Genetic effects on beef tenderness in *Bos indicus* composite and *Bos taurus* cattle. *Journal of Animal Science*, 75(7):1822-1830.

O'Halloran G.R., Troy D.J., Buckley D.J. and Reville W.J. (1997) The role of endogenous proteases in the tenderisation of fast glycolysing muscle. *Meat Science*, 47(3-4):187-210.

Ohira A., Honda O., Gauntt C.D., Yamamoto M., Hori K., Masutani H., Yodoi J. and Honda Y. (1994) Oxidative stress induces adult T cell leukemia derived factor/thioredoxin in the rat retina. *Laboratory investigation*, 70(2):279-285.

Ohkubo M., Miyagawa K., Osatomi K., Hara K., Nozaki Y. and Ishihara T. (2004) Purification and characterization of myofibril-bound serine protease from lizard fish (*Saurida undosquamis*) muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 137(1):139-150.

Oliván M., Martínez A., Osoro K., Sañudo C., Panea B., Olleta J.L., Mar Campo M., M. Àngels Oliver, Serra X., Gil M. and Piedrafita J. (2004) Effect of muscular hypertrophy on physico-chemical, biochemical and texture traits of meat from yearling bulls. *Meat Science*, 68(4):567-575.

Ono Y., Solomon M.B., Evock-Clover C.M., Steele N.C. and Maruyama K. (1995) Effects of porcine somatotropin administration on porcine muscles located within different regions of the body. *Journal of Animal Science*, 73(8):2282-2288.

O'Riordan M.X., Bauler L.D., Scott F.L. and Duckett C.S. (2008) Inhibitor of apoptosis proteins in eukaryotic evolution and development: a model of thematic conservation. *Developmental Cell*, 15(4):497-508.

Otsuka Y., Homma N., Shiga K., Ushiki J., Ikeuchi Y. and Suzuki A. (1998) Purification and properties of rabbit muscle proteasome, and its effect on myofibrillar structure. *Meat Science*, 49(4):365-378.

Ouali, A. (1990). La maturation des viandes: facteurs biologiques et technologiques de variation. *Viandes et produits carnés*, 11:281-290.

Ouali A. (1991) Conséquences des traitements technologiques sur la qualité de la viande. *INRA Productions Animales*, 4(3):195-208.

Ouali A. (1992) Proteolytic and physicochemical mechanisms involved in meat texture development. *Biochimie*, 74(3):251-265.

Ouali A. and Talmant A. (1990) Calpains and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal muscles. *Meat Science*, 28(4):331-348.

Ouali A., Dufour E., Obled A., Deval C. and Valin C. (1988) Action of muscular proteinases on fast and slow myosins. Relation with post-mortem proteolysis in muscles of variable contractility. *Reproduction, Nutrition, Development*, 28(3B):839-844.

- Ouali A., Rouchon P., Zabari M., Berri M., Zamora, F. and Tassy C.** (1995) Natural serine and cysteine proteinase inhibitors in bovine skeletal muscle. In Ouali A., Demeyer D. & Smulders F. J. M. Expression of tissue proteinases and regulation of protein degradation as related to meat quality. Utrecht (NL) : ECCEAMST, 1995, pp. 173-198.
- Ouali A., Herrera-Mendez C.H., Coulis G., Becila S., Boudjellal A., Aubry L. and Sentandreu M.A.** (2006) Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Science*, 74(1):44-58.
- Ozawa S., Mitsuhashi T., Mitsumoto M., Matsumoto S., Itoh N., Itagaki K., Kohno Y. and Dohgo T.** (2000) The characteristics of muscle fiber types of *longissimus thoracis* muscle and their influences on the quantity and quality of meat from Japanese Black steers. *Meat Science*, 54(1):65-70.
- Padua M.B., Kowalski A.A., Cañas M.Y. and Hansen P.J.** (2009) The molecular phylogeny of uterine serpins and its relationship to evolution of placentation. *The FASEB journal*, à paraître.
- Page B.T., Casas E., Heaton M.P., Cullen N.G., Hyndman D.L., Morris C.A., Crawford A.M., Wheeler T.L., Koohmaraie M., Keele J.W. and Smith T.P.** (2002) Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in *CAPNI* for association with meat tenderness in cattle. *Journal of Animal Science*, 80(12):3077-3085.
- Page B.T., Casas E., Quaas R.L., Thallman R.M., Wheeler T.L., Shackelford S.D., Koohmaraie M., White S.N., Bennett G.L., Keele J.W., Dikeman M.E. and Smith T.P.** (2004) Association of markers in the bovine *CAPNI* gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. *Journal of Animal Science*, 82(12):3474-3481.
- Pak S.C., Kumar V., Tsu C., Luke C.J., Askew Y.S., Askew D.J., Mills D.R., Brömme D. and Silverman G.A.** (2004) SRP-2 is a cross-class inhibitor that participates in postembryonic development of the nematode *Caenorhabditis elegans*: initial characterization of the clade L serpins. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(15):15448-15459.
- Pak S.C., Tsu C., Luke C.J., Askew Y.S. and Silverman G.A.** (2006) The *Caenorhabditis elegans* muscle specific serpin, SRP-3, neutralizes chymotrypsin-like serine peptidases. *Biochemistry*, 45(14):4474-4480.
- Parr T., Sensky P.L., Scothern G.P., Bardsley R.G., Buttery P.J., Wood J.D. and Warkup C.** (1999) Relationship between skeletal muscle-specific calpain and tenderness of conditioned porcine longissimus muscle. *Journal of Animal Science*, 77(3):661-668.
- Patnaik M.M. and Moll S.** (2008) Inherited antithrombin deficiency: a review. *Haemophilia*, 14(6):1229-1239.
- Pelissier P., Delourme D., Germot A., Blanchet X., Becila S., Maftah A., Leveziel H., Ouali A. and Bremaud L.** (2008) An original SERPINA3 gene cluster: elucidation of genomic organization and gene expression in the *Bos taurus* 21q24 region. *BMC Genomics*, 9:151.
- Penfield M.P. and Meyer B.H.** (1975) Changes in tenderness and collagen of beef semitendinosus heated at two rates. *Journal of Food Science*, 40(1):150-154.
- Pérez Borla O., Martone C.B. and Sánchez J.J.** (1998) Protease I Inhibitor System in Fish Muscle: A Comparative Study. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 119(1):101-105.
- Peters J.M., Franke W.W. and Kleinschmidt J.A.** (1994) Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(10):7709-7718.
- Petrache I., Fijalkowska I., Medler T.R., Skirball J., Cruz P., Zhen L., Petrache H.I., Flotte T.R. and Tudor R.M.** (2006) Alpha-1 antitrypsin inhibits caspase-3 activity, preventing lung endothelial cell apoptosis. *The American Journal of Pathology*, 169(4):1155-1166.
- Picard, B., Robelin J. and Geay, Y.** (1995) Influence of castration and postnatal energy restriction on the contractile and metabolic characteristics of bovine muscle. *Annales de Zootechnie*, 44(4): 347-357.

- Potempa J., Korzus E. and Travis J.** (1994) The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(23):15957-15960.
- Pulford D.J., Fraga Vazquez S., Frost D.F., Fraser-Smith E., Dobbie P. and Rosenfold K.** (2008) The intracellular distribution of small heat shock proteins in post-mortem beef is determined by ultimate pH. *Meat Science*, 79(4):623-630.
- Pulford D.J., Dobbie P., Fraga Vazquez S., Fraser-Smith E., Frost D.A. and Morris C.A.** (2009) Variation in bull beef quality due to ultimate muscle pH is correlated to endopeptidase and small heat shock protein levels. *Meat Science*, 83(1):1-9.
- Purslow P.P.** (2005). Intramuscular connective tissue and its role in meat quality. *Meat Science*, 70(3):435-447.
- Quillet-Mary A., Jaffrézou J.P., Mansat V., Bordier C., Naval J. and Laurent G.** (1997) Implication of mitochondrial hydrogen peroxide generation in ceramide-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(34):21388-21395.
- Quinsey N.S., Greedy A.L., Bottomley S.P., Whisstock J.C. and Pike R.N.** (2004) Antithrombin: in control of coagulation. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36(3):386-389.
- Ragg H., Lokot T., Kamp P.B., Atchley W.R. and Dress A.** (2001) Vertebrate serpins: construction of a conflict-free phylogeny by combining exon-intron and diagnostic site analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 18(4):577-584.
- Rau J.C., Beaulieu L.M., Huntington J.A. and Church F.C.** (2007) Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5 Suppl 1:102-115.
- Rawlings N.D. and Barrett A.J.** (1990) Evolution of proteins of the cystatin superfamily. *Journal of Molecular Evolution*, 30(1):60-71.
- Rawlings N.D. and Barrett A.J.** (1993) Evolutionary families of peptidases. *The Biochemical journal*, 290(Pt 1):205-218.
- Rawlings N.D., Tolle D.P. and Barrett A.J.** (2004a) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*, 32(Database issue):D160-164.
- Rawlings N.D., Tolle D.P. and Barrett A.J.** (2004b) Evolutionary families of peptidase inhibitors. *The Biochemical Journal*, 378(Pt 3):705-716.
- Raynaud P., Gillard M., Parr T., Bardsley R., Amarger V. and Levéziel H.** (2005) Correlation between bovine calpastatin mRNA transcripts and protein isoforms. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 440(1):46-53.
- Reagan J.O., Carpenter Z.L. and Smith G.C.** (1976) Age-related traits affecting the tenderness of the bovine longissimus muscle. *Journal of Animal Science*, 43(6):1198-1205.
- Renand G.** (1985) Genetic parameters of French beef breeds used in crossbreeding for young bull production. II. Slaughter performance. *Génétique, Sélection, Evolution*, 17(2):265-281.
- Renand G., Malafosse A., Ménessier F., Levéziel H., Hocquette J.F., Lepetit J., Rousset S., Denoyelle C. and Dodelin V.** (2006) Genetic variability of meat quality in the French Charolais, Limousin and Blonde d'Aquitaine beef breeds. 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, August 13-18, 2006, Belo Horizonte, Brazil.
- Renatus M., Zhou Q., Stennicke H.R., Snipas S.J., Turk D., Bankston L.A., Liddington R.C. and Salvesen G.S.** (2000) Crystal structure of the apoptotic suppressor CrmA in its cleaved form. *Structure*, 8(7):789-797.
- Rexroad III C.E., Bennett G.L., Stone R.T., Keele J.W., Fahrenkrug S.C., Freking B.A., Kappes S.M. and Smith T.P.** (2001) Comparative mapping of BTA15 and HSA11 including a region containing a QTL for meat tenderness. *Mammalian Genome*, 12(7):561-565.

- Reuter B.J., Wulf D.M. and Maddock R.J.** (2002) Mapping intramuscular tenderness variation in four major muscles of the beef round. *Journal of Animal Science*, 80(10):2594-2599.
- Rhee M.S., Wheeler T.L., Shackelford S.D. and Koohmaraie M.** (2004) Variation in palatability and biochemical traits within and among eleven beef muscles. *Journal of Animal Science*, 82(2):534-550.
- Riedl S.J. and Shi Y.** (2004) Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(11):897-907.
- Riley D.G., Chase Jr., C.C., Hammond, A.C., West, R.L., Johnson, D.D., Olson, T.A. and Coleman S.W.** (2003) Estimated genetic parameters for palatability traits of steaks from Brahman cattle. *Journal of Animal Science*, 81(1):54-60.
- Riley D.G., Johnson D.D., Chase C.C.J., West R.L., Coleman S.W. Olson T.A. and Hammond A.C.** (2005) Factors influencing tenderness in steaks from Brahman cattle. *Meat Science*, 70(2):347-356.
- Robert N., Briand M., Taylor R. and Briand Y.** (1999) The effect of proteasome on myofibrillar structures in bovine skeletal muscle. *Meat Science*, 51(2):149-153.
- Roberts T.H., Hejgaard J., Saunders N.F., Cavicchioli R. and Curmi P.M.** (2004) Serpins in unicellular Eukarya, Archaea, and Bacteria: sequence analysis and evolution. *Journal of molecular evolution*, 59(4):437-447.
- Rohrer G.A., Thallman R.M., Shackelford S., Wheeler T. and Koohmaraie M.** (2006) A genome scan for loci affecting pork quality in a Duroc-Landrace F₂ population. *Animal Genetics*, 37(1):17-27.
- Rosenvold K., North M., Devine C., Micklander E., Hansen P., Dobbie P. and Wells R.** (2008) The protective effect of electrical stimulation and wrapping on beef tenderness at high *pre rigor* temperatures. *Meat Science*, 79(2):299-306.
- Rowe L.J., Maddock K.R., Lonergan S.M. and Huff-Lonergan E.** (2004) Oxidative environments decrease tenderization of beef steaks through inactivation of mu-calpain. *Journal of Animal Science*, 82(11):3254-3266.
- Rupinder S.K., Gurpreet A.K. and Manjeet S.** (2007) Cell suicide and caspases. *Vascular Pharmacology*, 46(6):383-393.
- Saikumar P., Dong Z., Mikhailov V., Denton M., Weinberg J.M. and Venkatachalam M.A.** (1999) Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *The American Journal of Medicine*, 107(5):489-506.
- Sakamaki K. and Satou Y.** (2009) Caspases: evolutionary aspects of their functions in vertebrates. *Journal of Fish Biology*, 74(4):727-753.
- Salem M., Kenney P.B., Killefer J. and Nath J.** (2004) Isolation and in vitro characterization of the calpains from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle and their role in texture development. *Journal of Muscle Foods*, 15(4):245-255.
- Sangorrín M.P., Martone C.B. and Sánchez J.J.** (2000) Identification of a myofibril-bound serine protease and its endogenous inhibitor in mouse skeletal muscle. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 32(11-12):1213-1222.
- Sangorrín M.P., Martone C.B. and Sánchez J.J.** (2002) Myofibril-bound serine protease and its endogenous inhibitor in mouse: extraction, partial characterization and effect on myofibrils. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 131(4):713-723.
- Savell, J.W., Lorenzen C.L., Neely T.R., Miller R.K., Tatum J.D., Wise J.W., Taylor J.F., Buyck M.J. and Reagan J.O.** (1999) Beef Customer Satisfaction: Cooking method and degree of doneness effects on the top sirloin steak. *Journal of Animal Science*, 77(3):645-653.

- Sawdy J.C., Kaiser S.A., St-Pierre N.R. and Wick M.P.** (2004) Myofibrillar 1-D fingerprints and myosin heavy chain MS analyses of beef loin at 36 h postmortem correlate with tenderness at 7 days. *Meat Science*, 67(3):421-426.
- Schenkel F.S., Miller S.P., Ye X., Moore S.S., Nkrumah J.D., Li C., Yu J., Mandell I.B., Wilton J.W. and Williams J.L.** (2005) Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *Journal of Animal Science*, 83(9):2009-2020.
- Schenkel F.S., Miller S.P., Jiang Z., Mandell I.B., Ye X., Li H. and Wilton J.W.** (2006) Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *Journal of Animal Science*, 84:291-299.
- Schick C., Pemberton P.A., Shi G.P., Kamachi Y., Cataltepe S., Bartuski A.J., Gornstein E.R., Brömme D., Chapman H.A. and Silverman G.A.** (1998) Cross-class inhibition of the cysteine proteinases cathepsins K, L, and S by the serpin squamous cell carcinoma antigen 1: a kinetic analysis. *Biochemistry*, 37(15):5258-5266.
- Schnettler Morales B., Manquilef Baschler O. and Miranda Vargas H.** (2006) Beef Consumption Habits In Temuco, IX Region Of Chile. *Idesia*, 24(2):15-23.
- Schwartz B.S. and España F.** (1999) Two distinct urokinase-serpin interactions regulate the initiation of cell surface-associated plasminogen activation. *Journal of Biological Chemistry*, 274(21):15278-15283.
- Schwartz W. and Bird J.W.** (1977) Degradation of myofibrillar proteins by cathepsins B and D. *The Biochem Journal*, 167(3):811-820.
- Scott P.G. and Pearson C.H.** (1978) Cathepsin D: cleavage of soluble collagen and crosslinked peptides. *FEBS Letters*, 88(1):41-45.
- Sekikawa M., Yamamoto M., Fukushima M., Shimada K., Ishikawa T. and Mikami M.** (2001) Effect of proteasome inhibitor on sarcoplasmic protein of bovine skeletal muscle during storage. *Food Chemistry*, 73(1):17-21.
- Sellick G.S., Pitchford W.S., Morris C.A., Cullen N.G., Crawford A.M., Raadsma H.W. and Bottema C.D.** (2007) Effect of myostatin F94L on carcass yield in cattle. *Animal Genetics*, 38(5):440-446.
- Sensky P.L., Parr T., Bardsley R.G. and Buttery P.J.** (1996) The relationship between plasma epinephrine concentration and the activity of the calpain enzyme system in porcine longissimus muscle. *Journal of Animal Science*, 74(2):380-387.
- Sentandreu M.A., Coulis G. and Ouali A.** (2002) Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends in Food Science and Technology*, 13(12):400-421.
- Seyama K., Nukiwa T., Takabe K., Takahashi H., Miyake K. and Kira S.** (1991) Siiyama (serine 53 (TCC) to phenylalanine 53 (TTC)). A new alpha 1-antitrypsin-deficient variant with mutation on a predicted conserved residue of the serpin backbone. *Journal of Biological Chemistry*, 266(19):12627-12632.
- Shackelford S.D., Koohmaraie M., Miller M.F., Crouse J.D. and Reagan J.O.** (1991a) An evaluation of tenderness of the longissimus muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. *Journal of Animal Science*, 69(1):171-177.
- Shackelford S.D., Koohmaraie M., Whipple G., Wheeler T.L., Miller M.F., Crouse J.D., and Reagan J.O.** (1991b) Predictors of beef tenderness: Development and verification. *Journal of Food Science*, 56(5):1130-1135.
- Shackelford S.D., Koohmaraie M., Cundiff L.V., Gregory K.E., Rohrer G.A. and Savell J.W.** (1994) Heritabilities and phenotypic and genetic correlations for bovine *postrigor* calpastatin activity, intramuscular fat content, Warner-Bratzler shear force, retail product yield, and growth rate. *Journal of Animal Science*, 72(4):857-863.

- Shackelford S.D., Wheeler T.L. and Koohmaraie M.** (1997) Tenderness classification of beef: 1. Evaluation of beef longissimus shear force at 1 or 2 days post mortem as a predictor of aged beef tenderness, *Journal of Animal Science*, 75(9):2417-2422.
- Sherbeck J.A., Tatum J.D., Field T.G., Morgan J.B. and Smith G.C.** (1996) Effect of phenotypic expression of Brahman breeding on marbling and tenderness traits. *Journal of Animal Science*, 74(2):304-309.
- Shi Y.** (2002) Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular Cell*, 9(3):459-470.
- Shieh B.H., Potempa J. and Travis J.** (1989) The use of alpha 2-antiplasmin as a model for the demonstration of complex reversibility in serpins. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(23):13420-13423.
- Silverman G.A., Bird P.I., Carrell R.W., Church F.C., Coughlin P.B., Gettins P.G., Irving J.A., Lomas D.A., Luke C.J., Moyer R.W., Pemberton P.A., Remold-O'Donnell E., Salvesen G.S., Travis J. and Whisstock J.C.** (2001) The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(36):33293-33296.
- Simmons N.J., Daly C.C., Cummings T.L., Morgan S.K., Johnson N.V. and Lombard A.** (2008) Reassessing the principles of electrical stimulation. *Meat Science*, 80(1):110-122.
- Sinclair K.D., Lobley G.E., Horgan G.W., Kyle D.J., Porter A.D., Matthews K.R., Warkup C.C. and Maltin C.A.** (2001) Factors influencing beef eating quality.1. Effects of nutritional regimen and genotype on organoleptic properties and instrumental texture. *Animal Science*, 72(2):269-277.
- Smith I.J. and Dodd S.L.** (2007) Calpain activation causes a proteasome-dependent increase in protein degradation and inhibits the Akt signalling pathway in rat diaphragm muscle. *Experimental physiology*, 92(3):561-573.
- Smith T.P., Casas E., Rexroad C.E. III, Kappes S.M. and Keele J.W.** (2000) Bovine *CAPNI* maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness. *Journal of Animal Science*, 78(10):2589-2594.
- Smith T., Domingue J.D., Paschal J.C., Franke D.E., Bidner T.D. and Whipple G.** (2007) Genetic parameters for growth and carcass traits of Brahman steers. *Journal of Animal Science*, 85(6):1377-1384.
- Smith T., Thomas M.G., Bidner T.D., Paschal J.C. and Franke D.E.** (2009) Single nucleotide polymorphisms in Brahman steers and their association with carcass and tenderness traits. *Genetics and Molecular Research*, 8(1):39-46.
- Soo Kim Y., Ong A., Bobbili N., DuPont M.W. and Fukumoto G.K.** (2007) Evaluation of meat tenderness of forage-finished cattle produced in Hawai'i, and factors affecting the tenderness. *Food Safety and Technology*, FST-27.
- Sorimachi H., Toyama-Sorimachi N., Saido T.C., Kawasaki H., Sugita H., Miyasaka M., Arahata K., Ishiura S. and Suzuki K.** (1993) Muscle-specific calpain, p94, is degraded by autolysis immediately after translation, resulting in disappearance from muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 268(14):10593-10605.
- Splan R.K., Cundiff L.V. and Van Vleck L.D.** (1998) Genetic parameters for sex-specific traits in beef cattle. *Journal of Animal Science*, 76(9):2272-2278.
- Stark K.R. and James A.A.** (1998) Isolation and characterization of the gene encoding a novel factor Xa-directed anticoagulant from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(33):20802-20809.
- Stauber W.T., Fritz V., Dahlmann B. and Reinauer H.** (1983) Immunohistochemical localization of two proteinases in skeletal muscle. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 31(6):827-830.
- Steen D., Claeys E., Uytterhaegen L., De Smet S. and Demeyer D.** (1997) Early post-mortem conditions and the calpain/calpastatin system in relation to tenderness of double-muscled beef. *Meat Science*, 45(3):307-319.

- Steenbakkers P.J., Irving J.A., Harhangi H.R., Swinkels W.J., Akhmanova A., Dijkerman R., Jetten M.S., van der Drift C., Whisstock J.C. and Op den Camp H.J.** (2008) A serpin in the cellulosome of the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2. *Mycological Research*, 112(Pt 8):999-1006.
- Stennicke H.R. and Salvesen G.S.** (1997) Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7, and -8. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(41):25719-25723.
- Stennicke H.R. and Salvesen G.S.** (1999) Catalytic properties of the caspases. *Cell Death and Differentiation*, 6(11):1054-1059.
- Stinckens A., Luyten T., Bijttebier J., Van den Maagdenberg K., Dieltiens D., Janssens S., De Smet S., Georges M. and Buys N.** (2008) Characterization of the complete porcine *MSTN* gene and expression levels in pig breeds differing in muscularity. *Animal Genetics*, 39(6):586-596.
- Stone R.T., Casas E., Smith T.P.L., Keele J.W., Harhay G., Bennett G.L., Koohmaraie M., Wheeler T.L., Shackelford S.D. and Snelling W.M.** (2005) Identification of genetic markers for fat deposition and meat tenderness on bovine chromosome 5: Development of a low-density single nucleotide polymorphism map. *Journal of Animal Science*, 83(10):2280-2288.
- Stratil A. and Kopečný M.** (1999) Genomic organization, sequence and polymorphism of the porcine myostatin (*GDF8*; *MSTN*) gene. *Animal Genetics*, 30(6):468-470.
- Strickland D.K., Ashcom J.D., Williams S., Burgess W.H., Migliorini M. and Argraves W.S.** (1990) Sequence identity between the alpha 2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(29):17401-17404.
- Strydom P.E. and Nel E.** (1999). The effect of supplementation period of a beta-agonist (zilpaterol), electrical stimulation, and ageing period on meat quality characteristics. In Proceedings of the 45th international congress of meat science and technology (Vol. 2, pp. 58–59). Yokohama, Japan.
- Strydom P.E., Naude R.T., Smith M.F., Scholtz M.M. and van Wyk J.B.** (2000) Characterisation of indigenous African cattle breeds in relation to meat quality traits. *Meat Science*, 55(1):79-88.
- Swanek S.S., Morgan J.B., Owens F.N., Gill D.R., Strasia C.A., Dolezal H.G. and Ray F.K.** (1999) Vitamin D3 supplementation of beef steers increases longissimus tenderness. *Journal of Animal Science*, 77(4):874-881.
- Tamura K., Dudley J. Nei M. and Kumar S.** (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution*, 24(8):1596-1599.
- Tanaka K.** (2009) The proteasome: overview of structure and functions. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 85(1):12-36.
- Tassy C., Herrera-Mendez C.H., Sentandreu M.A., Aubry L., Brémaud L., Péliissier P., Delourme D., Brillard M., Gauthier F., Levéziel H. and Ouali A.** (2005) Muscle endopin 1, a muscle intracellular serpin which strongly inhibits elastase: purification, characterization, cellular localization and tissue distribution. *The Biochemical Journal*, 388(Pt 1):273-280.
- Taveau M., Bourg N., Sillon G., Roudaut C., Bartoli M. and Richard I.** (2003) Calpain 3 is activated through autolysis within the active site and lyses sarcomeric and sarcolemmal components. *Molecular and Cellular Biology*, 23(24):9127-9135.
- Taylor J.F., Coutinho L.L., Herring K.L., Gallagher D.S. Jr, Brenneman R.A., Burney N., Sanders J.O., Turner J.W., Smith S.B., Miller R.K., Savell J.W. and Davis S.K.** (1998) Candidate gene analysis of *GHI* for effects on growth and carcass composition of cattle. *Animal Genetics*, 29(3):194-201.
- Taylor R.G., Geesink G.H., Thompson V.F., Koohmaraie M. and Goll D.E.** (1995a) Is Z-disk degradation responsible for *postmortem* tenderization? *Journal of Animal Science*, 73(5):1351-1367.

- Taylor R.G., Ouali A. and Goll D.E.** (1995b) Enzyme localization during postmortem muscle tenderization. In Ouali A., Demeyer D. & Smulders F. J. M. Expression of tissue proteinases and regulation of protein degradation as related to meat quality. Utrecht (NL) : ECCEAMST, 1995, pp. 173-198.
- Thomas A.R., Gondoza H., Hoffman L.C., Oosthuizen V. and Naudé R.J.** (2004) The roles of the proteasome, and cathepsins B, L, H and D, in ostrich meat tenderisation. *Meat Science*, 67(1):113-120.
- Thornberry N.A.** (1998) Caspases: key mediators of apoptosis. *Chemistry & Biology*, 5(5):R97-103.
- Torrescano G., Sánchez-Escalante A., Giménez B., Roncalés P. and Beltrán J.A.** (2003) Shear values of raw samples of 14 bovine muscles and their relation to muscle collagen characteristics. *Meat Science*, 64(1):85-91.
- Travis J. and Salvesen G.S.** (1983) Human plasma proteinase inhibitors. *Annual review of biochemistry*, 52:655-709.
- Tribot Laspiere P.** (2001) Effet de la suspension pelvienne sur la tendreté de la viande de boeuf. 8^{es} rencontres autour des recherches sur les ruminants. Paris. Poster.
- Tshidino S.C., Krause J., Adebisi A.P., Muramoto K. and Naudé R.J.** (2009) Purification and partial characterization of a myofibril-bound serine protease from ostrich skeletal muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 154(2):229-234.
- Turk V. and Bode W.** (1991) The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Letters*, 285(2):213-219.
- Turk V., Turk B. and Turk D.** (2001) Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *The EMBO Journal*, 20(17):4629-4633.
- Ulbrich S.E., Frohlich T., Schulke K., Englberger E., Waldschmitt N., Arnold G.J., Reichenbach H.D., Reichenbach M., Wolf E., Meyer H.H. and Bauersachs S.** (2009) Evidence for estrogen-dependent uterine serpin (SERPINA14) expression during estrus in the bovine endometrial glandular epithelium and lumen. *Biology of reproduction*, 81(4):795-805.
- Underwood K.R., Means W.J. and Du M.** (2008) Caspase 3 is not likely involved in the postmortem tenderization of beef muscle. *Journal of Animal Science*, 86(4):960-966.
- Uytterhaegen L., Claeys E. and Demeyer D.** (1994) Effects of exogenous protease effectors on beef tenderness development and myofibrillar degradation and solubility. *Journal of Animal Science*, 72(5):1209-1223.
- Valinsky A., Shani M. and Gootwine E.** (1990) Restriction fragment length polymorphism in sheep at the growth hormone locus is the result of variation in gene number. *Animal Biotechnology*, 1:135-144.
- Van Eenennaam A.L., Li J., Thallman R.M., Quaas R.L., Dikeman M.E., Gill C.A., Franke D.E. and Thomas M.G.** (2007) Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. *Journal of Animal Science*, 85(4):891-900.
- van Gent D., Sharp P., Morgan K. and Kalsheker N.** (2003) Serpins: structure, function and molecular evolution. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 35(11):1536-1547.
- van Laack R. L., Faustman C. and Sebranek J. G.** (1993) Pork quality and the expression of stress protein Hsp 70 in swine. *Journal of Animal Science*, 71(11): 2958-2964.
- Van Vleck L.D., Hakim A.F., Cundiff L.V., Koch R.M., Crouse J.D. and Boldman K.G.** (1992) Estimated breeding values for meat characteristics of crossbred cattle with an animal model. *Journal of Animal Science*, 70(2):363-371.
- Van Wart H.E. and Birkedal-Hansen H.** (1990) The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(14):5578-5582.

- Vater C.A., Mainardi C.L. and Harris E.D. Jr** (1979) Inhibitor of human collagenase from cultures of human tendon. *The Journal of Biological Chemistry*, 254(8):3045-3053.
- Weiseth E., Shackelford S.D., Wheeler T.L. and Koohmaraie M.** (2001) Effect of *postmortem* storage on m-calpain and m-calpain in ovine skeletal muscle. *Journal of Animal Science*, 79(6):1502-1508.
- Vercammen D., Belenghi B., van de Cotte B., Beunens T., Gavigan J.A., De Rycke R., Brackenier A., Inzé D., Harris J.L. and Van Breusegem F.** (2006) Serpin1 of Arabidopsis thaliana is a suicide inhibitor for metacaspase 9. *Journal of Molecular Biology*, 364(4):625-636.
- Verdière-Sahuquè M., Akaaboune M., Lachkar S., Festoff B.W., Jandrot-Perrus M., García L., Barlovatz-Meimon G. and Hantai D.** (1996) Myoblast fusion promotes the appearance of active protease nexin I on human muscle cell surfaces. *Experimental Cell Research*, 222(1):70-76.
- Vestergaard M., Therkildsen M., Henckel P., Jensen L.R., Andersen H.R. and Sejrsen K.** (2000) Influence of feeding intensity, grazing and finishing feeding on meat and eating quality of young bulls and the relationship between muscle fibre characteristics, fibre fragmentation and meat tenderness. *Meat Science*, 54(2):187-195.
- Vieira C., Cerdeño A., Serrano E., Lavín P. and Mantecón A.R.** (2007) Breed and ageing extent on carcass and meat quality of beef from adult steers (oxen). *Livestock Science*, 107(1): 62-69.
- Voisinet B.D., Grandin T., O'Connor S.F., Tatum J.D. and Deesing M.J.** (1997) *Bos indicus*-cross feedlot cattle with excitable temperaments have tougher meat and a higher incidence of borderline dark cutters. *Meat Science*, 46(4):367-377.
- Walling G.A., Visscher P.M., Wilson A.D., McTeir B.L., Simm G. and Bishop S.C.** (2004) Mapping of quantitative trait loci for growth and carcass traits in commercial sheep populations. *Journal of Animal Science*, 82(8):2234-2245.
- Watanabe A., Dale, C.C. and Devine C.** (1996) The effects of the ultimate pH of meat on tenderness changes during ageing. *Meat Science*, 42(1):67-78.
- Weaver A.D., Bowker B.C. and Gerrard D.E.** (2008) Sarcomere length influences *postmortem* proteolysis of excised bovine semitendinosus muscle. *Journal of Animal Science*, 86(8):1925-1932.
- Welgus H.G., Stricklin G.P., Eisen A.Z., Bauer E.A., Cooney R.V. and Jeffrey J.J.** (1979) A specific inhibitor of vertebrate collagenase produced by human skin fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 254(6):1938-1943.
- Wheeler T.L., Savell J.W., Cross H.R., Lunt D.K. and Smith S.B.** (1990) Mechanisms associated with the variation in tenderness of meat from Brahman and Hereford cattle. *Journal of Animal Science*, 68(12):4206-4220.
- Wheeler T.L., Cundiff L.V., Koch R.M. and Crouse J.D.** (1996) Characterization of biological types of cattle (cycle IV): carcass traits and longissimus palatability. *Journal of Animal Science*, 74(5):1023-1035.
- Wheeler T.L., Shackelford S.D., Casas E., Cundiff L.V. and Koohmaraie M.** (2001) The effects of Piedmontese inheritance and myostatin genotype on the palatability of longissimus thoracis, gluteus medius, semimembranosus, and biceps femoris. *Journal of Animal Science*, 79(12):3069-3074.
- Wheeler T.L., Cundiff L.V., Shackelford S.D. and Koohmaraie M.** (2004) Characterization of biological types of cattle (Cycle VI): Carcass, yield, and longissimus palatability traits. *Journal of Animal Science*, 82(4):1177-1189.
- Whipple G. and Koohmaraie M.** (1991) Degradation of myofibrillar proteins by extractable lysosomal enzymes and m-calpain, and the effects of zinc chloride. *Journal of Animal Science*, 69(11):4449-4460.
- Whipple G., Koohmaraie M., Dikeman M.E. and Crouse J.D.** (1990) Predicting beef-longissimus tenderness from various biochemical and histological muscle traits. *Journal of Animal Science*, 68(12):4193-4199.

- Whisstock J.C. and Bottomley S.P.** (2008) Structural biology: Serpins' mystery solved. *Nature*, 455(7217):1189-1190.
- Whisstock J., Skinner R. and Lesk A.M.** (1998) An atlas of serpin conformations. *Trends in Biochemical Sciences*, 23(2):63-67.
- White S.N., Casas E., Wheeler T.L., Shackelford S.D., Koohmaraie M., Riley D.G., Chase C.C. Jr, Johnson D.D., Keele J.W. and Smith T.P.** (2005) A new single nucleotide polymorphism in *CAPNI* extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. *Journal of Animal Science*, 83(9):2001-2008.
- Wiener P., Woolliams J.A., Frank-Lawale A., Ryan M., Richardson R.I., Nute G.R., Wood J.D., Homer D. and Williams J.L.** (2009) The effects of a mutation in the myostatin gene on meat and carcass quality. *Meat Science*, 83(1):127-134.
- Willems M.E.T. and Purslow P.P.** (1996) Effect of postrigor sarcomere length on mechanical and structural characteristics of raw and heat-denatured single porcine muscle fibres. *Journal of Texture Studies*, 27(2):217-233.
- Williamson R.A., Marston F.A., Angal S., Koklitis P., Panico M., Morris H.R., Carne A.F., Smith B.J., Harris T.J. and Freedman R.B.** (1990) Disulphide bond assignment in human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP). *The Biochemistry Journal*, 268(2):267-274.
- Wilson L.L., McCurley J.R., Ziegler J.H. and Watkins J.L.** (1976) Genetic parameters of live and carcass characters from progeny of polled Hereford sires and Angus-Holstein cows. *Journal of Animal Science*, 43(3):569-576.
- Woodbury R.G., Everitt M., Sanada Y., Katunuma N., Lagunoff D. and Neurath H.** (1978) A major serine protease in rat skeletal muscle: evidence for its mast cell origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(11):5311-5313.
- Wulf D.M., Tatum J.D., Green R.D., Morgan J.B., Golden B.L. and Smith G.C.** (1996) Genetic influences on beef *longissimus* palatability in Charolais- and Limousin-sired steers and heifers. *Journal of Animal Science*, 74(10):2394-2405.
- Wulf D.M., Emmett R.S., Leheska J.M. and Moeller S.J.** (2002) Relationships among glycolytic potential, dark cutting (dark, firm, and dry) beef, and cooked beef palatability. *Journal of Animal Science*, 80(7):1895-1903.
- Xu G., Cirilli M., Huang Y., Rich R.L., Myszka D.G. and Wu H.** (2001) Covalent inhibition revealed by the crystal structure of the caspase-8/p35 complex. *Nature*, 410(6827):494-497.
- Yamasaki M., Li W., Johnson D.J. and Huntington J.A.** (2008) Crystal structure of a stable dimer reveals the molecular basis of serpin polymerization. *Nature*, 455(7217):1255-1258.
- Yang X.Q., Liu H., Guo L.J., Xu Y. and Liu D.** (2007) The mutation site analysis on *CAPNI* gene of Wild boar, Min pig and Yorkshire. *Yi Chuan*, 29(5):581-586 (Abstract).
- Yang X.Q., Liu H., Guo L.J., Guan Q.Z., Xu Y. and Liu D.** (2008) Analysis of SNPs in partial exons and 3'UTR of *CAPNI* in porcine. *Yi Chuan*, 30(6):741-746 (Abstract).
- Yao T.S. and Hiner R.L.** (1953) Variability and heritability of tenderness and its relationship to other beef characters. *Journal of Animal Science*, 12(4):904 (Abstract).
- Yoo B.C., Aoki K., Xiang Y., Campbell L.R., Hull R.J., Xoconostle-Cázares B., Monzer J., Lee J.Y., Ullman D.E. and Lucas W.J.** (2000) Characterization of cucurbita maxima phloem serpin-1 (CmPS-1). A developmentally regulated elastase inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 275(45):35122-35128.

- Yu L., Tang H., Wang J., Wu Y., Zou L., Jiang Y., Wu C. and Li N.** (2007) Polymorphisms in the 5' regulatory region of myostatin gene are associated with early growth traits in Yorkshire pigs. *Science in China. Series C, Life sciences*, 50(5):642-647.
- Yu T.P., Wang L., Tuggle C.K. and Rothschild M.F.** (1999) Mapping genes for fatness and growth on pig chromosome 13: a search in the region close to the *PIT1* gene. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 116(4):269-280.
- Yue G., Russo V., Davoli R., Sternstein I., Brunsch C., Schroffelova D., Stratil A., Moser G., Bartenschlager H., Reiner G. and Geldermann H.** (2003) Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* chromosome 13. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 120(Suppl 1):103-110.
- Zamora F., Chaïb F. and Dransfield E.** (1998) Calpains and calpastatin from cold-shortened bovine *M. longissimus lumborum*. *Meat Science*, 49(1):127-133.
- Zamora F., Debiton E., Lepetit J., Lebert A., Dransfield E. and Ouali A.** (1996) Predicting variability of ageing and toughness in beef *M. longissimus lumborum et thoracis*. *Meat Science*, 43(3-4):321-333.
- Zamora F., Aubry L., Sayd T., Lepetit J., Lebert A., Sentandreu M.A. and Ouali A.** (2005) Serine peptidase inhibitors, the best predictor of beef ageing amongst a large set of quantitative variables. *Meat Science*, 71(4):730-742.
- Zapata I., Zerby H.N. and Wick M.** (2009) Functional proteomic analysis predicts beef tenderness and the tenderness differential. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11):4956-4963.
- Zeece M.G., Woods T.L., Keen M.A. and Reville W.J.** (1992) Role of proteinases and inhibitors in post-mortem muscle protein degradation. In Proceedongs of 45th annual reciprocal meat conference, Colorado, USA, p. 51-61.
- Zhang H.M., DeNise S.K. and Ax R.L.** (1996) Rapid communication: a novel DNA polymorphism of the bovine calpain gene detected by PCR-RFLP analysis. *Journal of Animal Science*, 74(6):1441.
- Zhou A., Wei Z., Read R.J. and Carrell R.W.** (2006) Structural mechanism for the carriage and release of thyroxine in the blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(36):13321-13326.
- Zhou A., Wei Z., Stanley P.L., Read R.J., Stein P.E. and Carrell R.W.** (2008a) The S-to-R transition of corticosteroid-binding globulin and the mechanism of hormone release. *Journal of Molecular Biology*, 380(1):244-251.
- Zhou G., Dudgeon C., Li M., Cao Y., Zhang L. and Jin H.** (2010) Molecular cloning of the *HGD* gene and association of SNPs with meat quality traits in Chinese red cattle. *Molecular Biology Reports*, 37(1):603-611.
- Zhou H., Hickford J.G. and Fang Q.** (2007a) Single nucleotide polymorphisms of the ovine calpain 3 (*CAPN3*) gene. *Molecular and Cellular Probes*, 21(1):78-79.
- Zhou H., Hickford J.G. and Gong H.** (2007b) Polymorphism of the ovine calpastatin gene. *Molecular and Cellular Probes*, 21(3):242-244.
- Zhou H., Byun S.O., Frampton C.M., Bickerstaffe R. and Hickford J.G.** (2008b) Lack of association between *CAST* SNPs and meat tenderness in sheep. *Animal Genetics*, 39(3):331-332.
- Zhou H., Hickford J.G. and Gong H.** (2009a) Identification of allelic polymorphism in the ovine leptin gene. *Molecular Biotechnology*, 41(1):22-25.
- Zhou H., Frampton C.M. and Hickford J.G.** (2009b) Variation in ovine *CAPN3* is not associated with meat tenderness. *Animal Genetics*, 40(2):251-252.
- Zhou Q., Snipas S., Orth K., Muzio M., Dixit V.M. and Salvesen G.S.** (1997) Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(12):7797-7800.

Zwaal R.F.A., Comfurius P. and Bevers E.M. (2005) Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(9):971-988.
