



HAL
open science

**PROTEOME ET TRANSCRIPTOME DU MUSCLE
LONGISSIMUS LUMBORUM DE PORC :
INFLUENCE DU MODE D'ELEVAGE, DE
L'ORIGINE GENETIQUE ET DU SEXE. RELATIONS
AVEC LES QUALITES DES VIANDES ANTHONY
KWASIBORSKI**

Anthony Kwasiborski

► **To cite this version:**

Anthony Kwasiborski. PROTEOME ET TRANSCRIPTOME DU MUSCLE LONGISSIMUS LUMBORUM DE PORC : INFLUENCE DU MODE D'ELEVAGE, DE L'ORIGINE GENETIQUE ET DU SEXE. RELATIONS AVEC LES QUALITES DES VIANDES ANTHONY KWASIBORSKI. Alimentation et Nutrition. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2008. Français. NNT : 2008CLF21828 . tel-00728366

HAL Id: tel-00728366

<https://theses.hal.science/tel-00728366>

Submitted on 5 Sep 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**PROTEOME ET TRANSCRIPTOME DU MUSCLE *LONGISSIMUS LUMBORUM* DE PORC :
INFLUENCE DU MODE D'ELEVAGE, DE L'ORIGINE GENETIQUE ET DU SEXE
RELATIONS AVEC LES QUALITES DES VIANDES**



ANTHONY KWASIBORSKI

**ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

N° d'ordre 478

THESE

Présentée à l'Université Blaise Pascal
Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

SPECIALITE :
SCIENCE DES ALIMENTS ET NUTRITION

Soutenue le 13 mars 2008

ANTHONY KWASIBORSKI

**PROTEOME ET TRANSCRIPTOME DANS LE MUSCLE LONGISSIMUS DE PORC:
INFLUENCE DU MODE D'ELEVAGE, DE L'ORIGINE GENETIQUE ET DU SEXE.
RELATION AVEC LES QUALITES DES VIANDES.**

Directeurs de thèse: Véronique Santé-Lhoutellier et Claudia Terlouw

Président :	J-M. Lobaccaro	Prof. Université B. Pascal, Clermont-Ferrand
Rapporteurs :	F. Pinet	DR INSERM/Institut Pasteur de Lille
	H. Rémignon	Prof. des Universités à l'INPT-ENSAT
Membres :	B. Lebret	IR INRA de Rennes
	C. Terlouw	CR INRA de Clermont-Ferrand/Theix
	V. Santé-Lhoutellier	CR INRA de Clermont-Ferrand/Theix



Laboratoire d'accueil
Equipe Biochimie et Protéines du Muscle
Unité Qualité des Produits Animaux
INRA Centre de Clermont-Ferrand / Theix
F-63122 Saint-Genès-Champanelle



Toi et moi, cochon, nous ne serons estimé qu'après notre mort.

Jules Renard, *Extrait de son Journal, 1893-1898.*

REMERCIEMENTS

Petit, j'avais prévenu mes parents que je poursuivrais mes études le plus longtemps possible. Aujourd'hui, je crois que je ne vais pas pouvoir aller plus loin. Oh oui ! Je sais, je pourrais refaire une thèse, mais maintenant que je connais le travail à fournir, je n'ose pas recommencer. Au début, tout va bien. Je me souviens de l'entretien : moi assis sur une chaise au milieu du bureau de G. Monin, entouré du propriétaire des lieux et chef de l'équipe Biochimie et Protéines du Muscle (BPM), de C. Terlouw, V. Santé-Lhoutellier et de Muriel, qui me questionnent pendant une demi heure jusqu'à la question fatidique : « Que signifie en statistique $p < 0,05$? » Dure la question, surtout que moi et les statistiques, ce n'étaient pas le grand amour à l'époque. Enfin, j'avais de petits souvenirs alors j'ai répondu « La probabilité de rejeter l'hypothèse nulle alors qu'elle est vraie doit être inférieure à 5% ». L'entretien avait dû bien se passer car 5 minutes plus tard G. Monin m'appelait pour m'engager. Durant ma thèse, j'ai su que de tous les candidats qu'ils avaient auditionnés, j'avais été le seul à avoir donné une réponse relativement correcte à cette question. J'espère que ce n'est pas que pour cette raison que j'ai été sélectionné !!!!!!! Malgré tous, je remercie donc G. Monin pour m'avoir accueilli dans son labo puis V. Santé-Lhoutellier pour m'avoir gardé après le départ en retraite de G. Monin.

La première année de thèse, pour le côté scientifique, j'ai réalisé les manip d'électrophorèses bidimensionnelles afin de créer ma base de données protéomiques utilisées durant mon doctorat. Je remercie d'ailleurs T. Sayd qui m'a appris la technique d'électrophorèse et guidé lors de l'analyse d'images, ainsi que C. Chambon pour m'avoir permis d'identifier les quelques points noirs présents sur les gels. En dehors du travail, grâce aux nombreux stagiaires qui ont effectué un séjour à BPM, j'ai eu de nombreuses soirées bien remplies. Merci donc à Alban, Muriel, Véro, Aurélie (arrivée à BPM le même jour que moi), La Tiatia, La Grognasse (elles se reconnaîtront), Jérôme G, Julien, Eléonore et nos deux mexicaines : Julia et Judith pour les pauses bien méritées durant la journée, les soirées kinitos et les soirées campings autour du feu de camp, parmi les chevaux et où les seuls personnes que l'on pouvait réveiller étaient les morts !!!!!!! (Et ce n'est pas qu'une expression car ils habitaient en face du champ où nous dormions).

J'ai commencé ma deuxième année par un séjour de 3 mois et demi en Angleterre, à Cambridge exactement, dans le laboratoire PIC, une entreprise anglaise qui a cofinancé ma thèse devenue par la suite Genus. Je remercie D. Rocha pour ses conseils durant les manip de RT-PCR quantitative qui me fournirent la base de données transcriptomique. Durant ce séjour, j'ai rencontré des collègues anglais qui m'ont aidé à me sentir bien dans leur labo et ont pardonné mon anglais et mon accent français. Merci à Andy, Oriane et tous ceux dont je ne me souviens plus des noms (j'espère qu'ils me pardonneront). Je remercie tout particulièrement Jamy et son amie pour m'avoir hébergé durant les 15 derniers jours de mon périple anglais. Durant cette escapade, merci aussi aux poulettes : Amélie et Karin, à François et à Will pour être venus me rendre visite à Londres, un week-end où on a profité du temps typique anglais, mais aussi des nombreux monuments de la ville. Merci aussi à Alban pour le week-end à Cambridge où nous avons pu apprécier la bière anglaise et du Bowling (Attention à bien prononcer « Baoling » sinon les anglais ne vous comprennent pas). Ces visites permettent d'avoir le moral loin de son pays, de sa famille et de ses amis. A mon retour, j'ai continué les analyses de la base de données protéomiques et débuté l'écriture de la première publication qui sera par la suite séparée en deux. Dans le labo, de nouveaux stagiaires étaient arrivés. L'ambiance était toujours aussi agréable, merci à Jérôme L et Maxime qui se sont intégrés dans l'équipe et à Romain (ou Funicus !) pour nos soirées PES et pour ses conversations (interminables !!!!!).

Puis la troisième année et demie a commencé. Côté travail, ça a été la plus difficile, les analyses, la soumission des deux premiers articles, leurs corrections, l'écriture et la soumission du troisième, et l'écriture du quatrième, la rédaction du manuscrit de thèse, la préparation de la soutenance, une véritable année de stress (Moi qui ne suis jamais stressé, vous imaginez mon état !!). D'ailleurs, je remercie particulièrement C. Terlouw, ma directrice scientifique, investigatrice du projet et une grande aide durant ma thèse. Merci Claudia pour m'avoir tant aidé, m'avoir guidé dans les différentes analyses, m'avoir expliqué encore et toujours les statistiques, m'avoir permis de soumettre quatre

articles pour ma thèse, pour les nombreux après-midi de réflexions sur le pourquoi du comment des résultats obtenus et surtout pour m'avoir supporté durant ces trois années sans se mettre en colère malgré mes étourderies. Un grand MERCI Claudia, j'ai beaucoup appris avec toi !!!! Merci également aux collègues de BPM, Elisabeth, Philippe, Michel, Sylvie, Laurent, Samira, Kangoo, Nourdine, Claude (la maman des stagiaires !) et bien sûr Pierrot pour leur accueil, leur gentillesse, les nombreux pots et pour les soirées cuisses de grenouilles. En dehors du boulot, heureusement qu'il y avait toujours les soirées avec les collègues et amis. Merci encore à La Tiatia, La Grognasse, Jérôme G, Aurélie et Régis, Eléonore, Emilie, Gérald, les microbiologistes du deuxième étage, Marilyne, Sébastien, Rénata (notre Brésilienne) et Jérémy (notre Lillois déglingo qui ne boit pas que de l'eau), pour toutes ces soirées en boîtes, à la Perdrix, les week-ends en Lozère ou à Aurillac et les nombreux saunas hammams. Merci à tous pour tous ces moments de détente qui m'ont permis de me vider la tête de temps en temps, pour votre soutien et pour m'avoir encouragé.

Puis le grand jour de la soutenance est arrivé, c'était le 13 mars 2008, à 14h, dans l'amphithéâtre R. Jarrige de l'INRA de Theix. Je me tenais debout sur l'estrade, dans mon costume gris clair, la cravate qui me serrait le cou, une envie d'aller aux toilettes toutes les 5 secondes, le ventre serré et la bouche sèche, devant une assemblée de 60 personnes environs. Quatorze heures, le jury entre dans l'amphithéâtre. Je remercie l'ensemble des membres de mon jury, composé du président du jury ; M. J-M. Lobaccaro, directeur de l'école doctorale des sciences de la vie et de la santé de Clermont-ferrand, 2 rapporteurs ; M^{me} F. Pinet, directrice de recherches à l'institut Pasteur de Lille et M. H Rémignon, professeur des université à l'INPT-ENSAT de Toulouse et trois autres membres du jury ; M^{me} B. Lebret, ingénieur de recherche à l'INRA de Rennes, Mme V. Santé-Lhoutellier, ma directrice de thèse et enfin de Mme C. Terlouw, ma directrice scientifique de thèse, pour leur participation. Le jury s'est installé et ma soutenance a débuté. Durant 45 minutes, j'ai expliqué le travail effectué durant mes 3 années et demi de thèse, sans accro, sans oubli, d'un niveau supérieur à celui des répétitions réalisées la semaine précédente (Je me suis surpris moi-même !!). Puis les mots de la fin arrivèrent ; « je vous remercie de votre attention » (ainsi que la gorgée d'eau si désirée depuis le début), mais malheureusement ces mots sonnent également le début de 2 longues heures de questions. N'ayant pas pu m'entraîner auparavant, mes réponses étaient approximatives et courtes. Les membres du jury me questionnaient chacun leur tour jusqu'à ce que M. Lobaccaro prenne la parole et me délivre. Quinze minutes de délibération du jury plus tard, le président me confirmait ma nomination au rang de « Docteur en Science des Aliments et Nutrition », sans mention car depuis début 2008 l'école doctorale n'en délivre plus. Enfin c'est terminé, on peut aller faire la fête !!!!!!! Je remercie tout le monde pour les cadeaux que vous m'avez offerts lors de mon pot de thèse (en particulier le massage qui fut très agréable même si j'ai eu du mal à me détendre à un certain moment !!!!!!!), ils n'étaient pas nécessaire mais ils font plaisir et on se sent apprécié.

Enfin, cette thèse, ces rencontres et ces voyages n'auraient pas pu être possible sans le soutien entier de mes parents. Jamais ils ne sont opposés à mes choix d'étudiant, ils m'ont toujours soutenu durant mes études, même si parfois c'était dur de me laissé partir loin de la maison (n'est ce pas maman ???). Ils ont été là pour me remonter le moral quand j'étais en Angleterre, ou pendant les derniers mois de thèse. Merci aussi à mon frère et à ma belle-sœur pour leur accueil sur Besançon et pour m'avoir donné la plus belle nièce du monde (oui je sais je ne suis peut-être pas objectif !!!!) : Léane et le plus beau neveu du monde : Mathieu.

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Photo 1 : Les principales races de porcs utilisées dans l'élevage français.

Figure 1 : Organisation et structure du muscle squelettique.

Figure 2 : Les différentes voies métaboliques de régénération de l'ATP dans la cellule.

Tableau 1 : Classification des fibres musculaires adaptée de Brooke et Kaiser (1970) et Peter et al. (1972).

Figure 3 : Mécanisme *post-mortem* d'acidification du muscle.

Figure 4 : Evolution de la diminution du pH *post-mortem*.

Figure 5 : La contraction musculaire entraîne une contraction longitudinale et transversale.

Figure 6 : Facteurs intrinsèques et extrinsèques possédant un effet direct ou indirect sur les qualités des viandes.

Figure 7 : Organisation des protéines

Figure 8 : Les 20 acides aminés constitutifs des protéines.

Figure 9 : Structure et schématisation de l'ARN de transfert, ici pour la méthionine.

Figure 10 : Structure de la petite et de la grosse

Figure 11 : Les étapes de la traduction.

Figure 12 : Le système d'adressage des protéines nouvellement synthétisées.

Figure 13 : Principe de l'électrophorèse bidimensionnelle.

Figure 14 : L'extraction fractionnée permet l'enrichissement des différentes fractions en protéines peu représentées.

Figure 15 : Principe du spectromètre de masse MALDI-ToF.

Figure 16 : Structure de l'ARN.

Tableau 2 : le code génétique, traduction des codons de l'ARNm en acides aminés.

Figure 17 : Les étapes de la transcription.

Figure 18 : Principe de l'épissage alternatif.

Figure 19 : Principe de la RT-PCR quantitative.

Figure 20 : Résultats obtenus par RT-PCR quantitative.

Figure 21 : La navette Glycérol phosphate.

Tableau 3 : Effet de facteurs de variation sur les paramètres de qualités des viandes.

Tableau 4 : Mécanismes biochimiques expliquant les relations entre les quantités de protéines et les paramètres de qualités des viandes.

REMERCIEMENTS.....	- 1 -
LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	- 5 -
INTRODUCTION.....	- 8 -
LE MUSCLE ET LA VIANDE DE PORC : ETAT DES CONNAISSANCES.....	- 11 -
1- Le porc : <i>Sus scrofa domesticus</i>	- 12 -
1.1- Généralités.....	- 12 -
1.2- Le type génétique.....	- 15 -
1.2.1- La race Large White.....	- 15 -
1.2.2- La race Landrace.....	- 16 -
1.2.3- La race Duroc.....	- 17 -
1.2.4- La race Piétrain.....	- 17 -
1.2.5- La race Meishan.....	- 18 -
1.3- Le marché du porc en 2006.....	- 18 -
2- Le muscle : organisation et fonctionnement.....	- 20 -
2.1- Structure.....	- 20 -
2.2- Métabolisme énergétique musculaire.....	- 22 -
2.2.1- La phosphocréatine.....	- 22 -
2.2.2- La myokinase.....	- 22 -
2.2.3- Le catabolisme du glycogène musculaire.....	- 24 -
2.2.4- Les autres sources d'énergie.....	- 27 -
2.3- Les types de fibres musculaires.....	- 29 -
3- Du muscle à la viande.....	- 32 -
3.1- Evolution post-mortem des propriétés biochimiques.....	- 32 -
3.2- Evolution post-mortem des propriétés mécaniques.....	- 32 -
4- Les critères de qualités des viandes.....	- 33 -
4.1- Les qualités technologiques.....	- 35 -
4.1.1- Le pH <i>post-mortem</i>	- 35 -
4.1.2- Le pouvoir de rétention d'eau.....	- 39 -
4.2- Les qualités sensorielles.....	- 40 -
4.2.1- La couleur.....	- 41 -
4.2.2- La tendreté.....	- 41 -
4.2.3- La jutosité.....	- 44 -
4.3- Les facteurs de variation des qualités de viande.....	- 44 -
4.3.1- Les facteurs intrinsèques.....	- 44 -
4.3.2- Les facteurs extrinsèques.....	- 47 -
LE PROTEOME ET LE TRANSCRIPTOME :.....	- 51 -
DEFINITIONS ET METHODES D'ETUDE.....	- 51 -
1- Le protéome.....	- 52 -
1.1- Définition.....	- 52 -
1.2- La structure des protéines.....	- 54 -
1.3- La traduction.....	- 57 -
1.3.1- Les éléments nécessaires à la traduction.....	- 57 -
1.3.2- Les étapes de la traduction.....	- 61 -
1.4- La régulation de la traduction.....	- 62 -
1.4.1- Importance de la structure de l'ARNm.....	- 62 -
1.4.2- Les facteurs d'initiation eIF4.....	- 63 -
1.4.3- Les facteurs d'élongation.....	- 64 -
1.5- Le devenir des protéines synthétisées.....	- 66 -
1.5.1- Le système d'adressage.....	- 66 -

1.5.2- Les modifications post-traductionnelles.....	- 66 -
1.6- Méthodes d'étude du protéome	- 67 -
1.6.1- L'électrophorèse bidimensionnelle.....	- 69 -
1.6.2- La spectrométrie de masse : MALDI-ToF	- 73 -
1.6.3- Apports de la protéomique à l'étude des qualités de viande.	- 75 -
2- Le transcriptome	- 80 -
2.1- Définition.....	- 80 -
2.2- La structure des ARN	- 80 -
2.3- La transcription.....	- 82 -
2.3.1- La synthèse d'un transcrit primaire	- 82 -
2.3.2- Les modifications post-transcriptionnelles de l'ARNm	- 85 -
2.4- Régulation de l'expression de l'information génétique.....	- 85 -
2.5- Méthode d'étude du transcriptome	- 86 -
2.5.1- Le principe de la RT-PCR	- 88 -
2.5.2- Apport de la transcriptomique dans l'étude des qualités de viande	- 91 -
CHAPITRE 1	- 94 -
Pig Longissimus lumborum proteome: Part I:	- 94 -
Effects of genetic background, rearing environment and gender.	- 94 -
CHAPITRE 2	- 95 -
Pig Longissimus lumborum proteome: Part II:.....	- 95 -
Relationships between protein content and meat quality.....	- 95 -
CHAPITRE 3	- 96 -
Specific proteins allow classification of pigs according to.....	- 96 -
sire breed, rearing environment and gender.....	- 96 -
CHAPITRE 4	- 97 -
Gene expression is little influenced by genetic and.....	- 97 -
rearing aspects, but is correlated with variations in pork quality traits.	- 97 -
DISCUSSION GENERALE	- 98 -
1- Importance des facteurs de variations	- 101 -
1.1- Un effet majeur : le sexe.....	- 103 -
1.2- Des effets plus limités : le mode d'élevage et l'origine génétique	- 107 -
2- l'expression des gènes	- 110 -
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	- 113 -
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	- 116 -
LISTE DES PUBLICATIONS	- 135 -

INTRODUCTION

Le projet européen « Sustainability in the production of pork with improved nutritional and eating quality using strategic feeding in out-door production », SUSPORKQUAL QLK5-2000-00162 (Coordinateur A. Karlsson) a pour objectif d'établir un système de production durable de porcs en extérieur, applicable dans les pays de l'union européenne, qui tient compte de la demande croissante des consommateurs : augmentation des qualités organoleptiques des viandes, maîtrise du bien-être des animaux, sécurité alimentaire et protection de l'environnement. Dans le cadre de ce projet, mon laboratoire d'accueil, l'équipe Biochimie et Protéines du Muscle s'est intéressée aux contributions du type génétique (pères Duroc ou Large White), du mode d'élevage (intérieur ou extérieur) et du sexe (mâle castré ou femelle) sur les qualités technologiques et sensorielles de la viande de porcs. Ma thèse intitulée « Protéome et transcriptome dans le muscle *Longissimus lumborum* de porc : Influence du mode d'élevage, de l'origine génétique et du sexe. Relations avec les qualités des viandes. » s'inscrit dans ce projet. Elle était cofinancée par l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) basé en France et l'entreprise Pig Improvement Company (PIC) basée en Grande-Bretagne devenue depuis Genus basée aux Etats-Unis.

Avec une consommation de 19600 milliers de tonnes équivalent carcasses en 2005, la viande de porc est la plus consommée en Europe, ainsi qu'en France (IFIP, 2005). Les qualités des viandes de porc montrent toutefois une forte variabilité, en partie due à des variations dans le métabolisme énergétique musculaire *post-mortem*. Celui-ci est défini comme l'ensemble des réactions biochimiques survenant dans le muscle au cours de la période allant de la mort de l'animal jusqu'à la préparation de la viande avant consommation. Les événements *post-mortem* les plus étudiés sont la glycolyse, l'oxydation des lipides, mais aussi les modifications des protéines : dénaturation, protéolyse, oxydation. De nombreux facteurs, dépendant de l'animal (génétique, mode d'élevage, alimentation, réactivité au stress d'abattage...) ou de la technologie (mode d'étourdissement...), peuvent influencer le métabolisme *post-mortem*, donc les paramètres de qualités des viandes. L'approche classique pour étudier le métabolisme *post-mortem* est souvent dirigée envers un type de réaction et se fonde sur la quantification d'un ou plusieurs effecteurs ou produits de cette réaction. Or, tous les événements interagissent étroitement entre eux et le résultat de ces interactions conditionne les propriétés technologiques, sensorielles voire nutritionnelles des viandes. Ainsi, ces interactions justifient en partie le recours à des méthodes d'études dites globales comme la protéomique ou la transcriptomique.

Dans un contexte où le consommateur apparaît de plus en plus soucieux de la qualité des aliments qu'il consomme mais également du bien-être des animaux de boucherie, la filière s'intéresse au développement de nouvelles techniques d'élevage répondant à ces attentes. L'objectif final de mon travail était, ainsi, de mieux comprendre l'origine des variations dans les paramètres de qualités des viandes de porc en étudiant l'influence de facteurs de variation, comme le mode d'élevage, l'origine génétique et le sexe sur les quantités de protéines musculaires et l'expression des gènes en relation avec les qualités des viandes. Cet objectif doit permettre, à terme, d'accéder à la maîtrise de la qualité des viandes de porc.

Afin de répondre à cet objectif, mon travail s'est divisé en 4 temps.

Le premier visait à étudier l'influence des trois facteurs de variation, mode d'élevage, race du père et sexe, sur les quantités de protéines impliquées dans le métabolisme cellulaire et sur les paramètres de qualités sensorielles et technologiques des viandes.

Le deuxième étudiait l'influence de ces mêmes facteurs de variation sur l'implication des différentes voies biochimiques dans le déterminisme des qualités des viandes.

Le troisième s'intéressait à améliorer les connaissances sur les relations entre les caractéristiques génétiques et environnementales d'une part et les mécanismes cellulaires d'autre part, en identifiant les protéines dont les taux sont spécifiques d'un type d'animal.

Enfin dans un quatrième temps, j'ai étudié les influences des différents facteurs de variation sur l'expression des gènes et les liens entre ces expressions, l'abondance des protéines et les qualités des viandes. Ce travail s'intéresse à l'identification de phénomènes, intervenant en amont dans la chaîne de réaction de synthèse des protéines, impliqués dans le déterminisme des qualités des viandes.

**LE MUSCLE ET LA VIANDE DE PORC :
ETAT DES CONNAISSANCES**

1- Le porc : *Sus scrofa domesticus*

1.1- Généralités

Le porc ou cochon domestique est un mammifère omnivore appartenant à la famille des suidés. Sa domestication aurait débuté 7000 ans avant J-C, en Egypte et Mésopotamie, très naturellement puisqu'il suivait les hommes en se nourrissant de leurs déchets. Aujourd'hui, il est élevé principalement pour la consommation de sa viande, mais pas uniquement. En effet, Brillat-Savarin, avocat et gastronome, dans son livre « Physiologie du goût » publié en décembre 1826, disait de lui : « Tout est bon dans le cochon » car en plus de la viande, il fournit le saindoux utilisé en cuisine, ses soies servent à la fabrication de pinceaux, sa peau fournit le cuir et sa constitution anatomique et biologique proche de l'homme ont fait du porc un modèle utilisé en recherche médicale et dans les applications thérapeutiques.

La conduite d'un élevage comprend 3 périodes principales :

- Le naissage : ce terme désigne le mois courant entre la naissance des porcelets et le sevrage. Les porcs sont des animaux qui présentent un cycle de reproduction court, c'est-à-dire que leur maturité sexuelle peut être atteinte dès l'âge de 6 mois. La truie n'a pas de cycle de reproduction saisonnier et possède une durée de gestation de trois mois, trois semaines et trois jours soit 115 jours en moyenne au bout de laquelle elle donne naissance à une douzaine de porcelets environ pesant chacun autour de 1,5 à 2 kg. Dans les premières heures de la naissance, les porcelets doivent téter le colostrum de la mère qui leur apporte une immunité microbienne. Les porcelets restent sous leur mère pendant quatre semaines en tétant tous les jours environ un litre chacun.
- Le post sevrage : le sevrage a lieu entre 21 et 28 jours après la naissance selon le mode d'élevage. Durant 5 semaines, les porcelets passent d'une alimentation lactée à une alimentation plus solide.
- L'engraissement : le porc peut réaliser des gains de poids quotidiens très importants, de l'ordre de 800 g, voire supérieure à 1kg, pour des porcs pesant de 30 à 100 kg. La conduite de l'engraissement doit donc permettre l'obtention d'une bonne croissance, d'un indice de consommation faible (rapport en la masse de nourriture ingérée et la prise de poids) et d'une carcasse la moins grasse possible. Pour cela, il faut veiller à une bonne conduite de

l'exploitation et à une alimentation équilibrée La durée d'engraissement est de 120 à 140 jours. En 2007, le poids moyen des porcs à l'abattage était de 117 kg.

En France, il existe trois principaux systèmes d'élevage, choisis par les éleveurs en fonction d'un certain nombre de contraintes économiques, écologiques et pratiques.

- Les élevages en bâtiment sur caillebotis : pour ces élevages, les animaux sont élevés à l'intérieur de bâtiments dont le sol est constitué de caillebotis permettant l'évacuation des déjections (lisier) dans des fosses situées dans la partie basse de ces bâtiments. Les déjections suivent ensuite un circuit par gravité jusque dans des fosses à lisier. Ce système d'élevage est le plus répandu en France et en Europe. Il représente plus de 90% des élevages de porcs français.
- Les élevages en bâtiments sur litière bio-maîtrisée (paille, sciure, etc.) : là encore, les animaux sont élevés dans des bâtiments mais sans caillebotis. Le sol, souvent bétonné, est recouvert par une litière (souvent de la paille). Autour de 5 % des élevages français correspondent à ce système d'élevage.
- Les élevages en plein air : les animaux sont parqués dans des prés et disposent de petites cabanes en taule et paillée à l'intérieur pour se protéger des intempéries et de l'ensoleillement. Très peu d'élevages ont adopté ce système (quelques pourcents).

Chacun de ces trois systèmes d'élevage présente des avantages et des inconvénients. Il existe des éleveurs qui les associent sur leur exploitation (exemple : naissance en plein air, post sevrage sur caillebotis et engraissement sur paille).

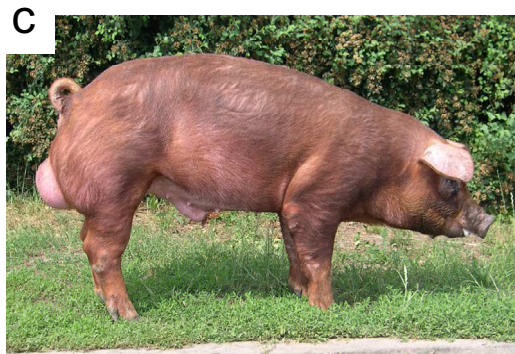
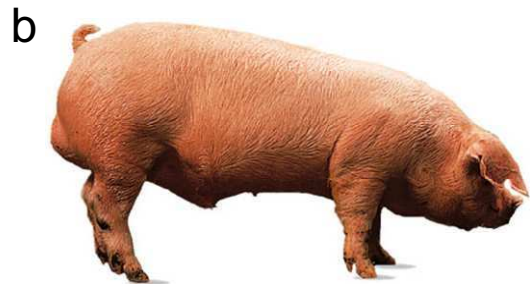
En France, en 2006, le nombre d'éleveurs, dont l'exploitation compte plus de 5 truies ou plus de 20 porcs, atteignait 14000. La production est principalement regroupée dans trois régions géographiques françaises ; 55% se situent en Bretagne, 11% dans les pays de la Loire et 4% en Basse Normandie.

En moyenne, la durée d'élevage d'un porc est de 6 à 7 mois. Les porcs destinés à la consommation sont abattus par saignée suite à son étourdissement par choc électrique. Après abattage, le porc est découpé en quatre parties principales : le jambon, la longe, l'épaule et la poitrine.

- Le jambon : il correspond à la région jambière et crurale, allant de la section de l'ilium jusqu'au point de coupe près de l'extrémité distale du membre postérieur. Les principaux muscles qui le composent sont le *Semimembranosus*, le *Semitendinosus*, le *Quadriceps*

Photo 1: Les principales races de porcs utilisées dans l'élevage français

- a. Verrat Large White
- b. Verrat Landrace
- c. Verrat Duroc
- d. Truie Piétrain
- e. Truie Meishan



femoris et le *Biceps femoris*. Son poids s'échelonne de 6 à 12 kg, poids qui déterminera son utilisation ultérieure.

- La longe : c'est la partie maigre et charnue sur le dos du porc. Elle est constituée de l'échine (partie antérieure), la pointe (partie postérieure entre le jambon et le filet), le carré (partie centrale), le travers (partie supérieure de la poitrine), le filet (partie centrale mais postérieure au carré) et le filet mignon (partie inférieurs du filet). Elle est principalement constituée des muscles *Longissimus dorsi* et *Psoas major*.
- L'épaule : elle correspond à la partie distale du membre antérieur après déjoints à l'articulation scapulo-humérale et est constituée de trois morceaux : la palette, l'épaule et le jarret. Les principaux muscles qui la composent sont le *Triceps brachii*, le *Pectorales profundi* et *superficiales* et le *Flexor digitorum profundus*.
- La poitrine : elle correspond à la région thoracique et abdominale comprise entre la 6^{ème} et la dernière côte, et est composée de la poitrine (proprement dite) et de la mouille. Elle est principalement constituée des muscles *Rectus abdominis* et *Transversus abdominis* et de gras.

1.2- Le type génétique

Dans le monde, 350 races de porc sont recensées. En France, 5 types génétiques sont principalement utilisés pour la production. Ils se distinguent par leurs performances de production et de reproduction : les races Large White, Landrace, Piétrain, Duroc et Meishan (photo 1). Le choix d'un type génétique pur ne permettant pas de répondre aux critères de production ; rusticité, prolificité, précocité, efficacité alimentaire, vitesse de croissance ou composition de la carcasse, les producteurs élèvent principalement des animaux issus de croisements.

1.2.1- La race Large White

Le Large White se distingue par sa couleur blanche, sa peau rose, ses flancs longs et profonds ainsi que, comme son nom l'indique, par sa grande taille (photo 1a). Cette race anglaise, originaire du comté de Yorkshire, arrive en tête des races améliorées pour leurs performances de croissance ; gain moyen quotidien et indice de consommation ainsi que pour la taille de leurs portées, leur grande production de lait et leurs qualités maternelles. Les

verrats Large White français sont aussi recherchés pour l'uniformité, et la qualité qu'ils apportent dans un élevage. La race occupe une position intermédiaire pour la teneur en muscle de la carcasse et fournit une viande maigre avec de bonnes qualités technologiques et organoleptiques. Cette race est également indemne du gène de sensibilité à l'halothane (Hal ou n) prédisposant, après l'abattage, à une diminution rapide du pH musculaire, phénomène fréquemment lié à la production de viande PSE (cf. paragraphe 4.3.1, p33).

En France, depuis 1990, la mise en place d'un plan de sélection basé sur l'utilisation de truies hyperprolififiques de la race a amélioré la taille des portées pouvant atteindre environ 14 porcelets. De ce fait, les femelles Large White, issues de ce plan, sont aujourd'hui très convoitées et leurs exportations sont en hausse. Tous les pays qui s'intéressent à l'élevage porcin ont importé le Large White français lui donnant une ampleur mondiale. Cette race occupe ainsi une position centrale dans la production porcine. Elle est associée aux Landrace pour la production de truies F1, mais également aux Piétrains pour la création de verrats F1.

1.2.2- La race Landrace

Le Landrace est un porc de grande taille possédant un squelette solide et une bonne musculature (photo 1b). Cette race, originaire du Danemark, possède des jambons bien développés, une croupe large, une longe musclée et un taux de maigre atteignant 56%. La longueur de sa carcasse, son efficacité dans la conversion alimentaire, sa faible quantité de gras et la qualité de sa viande de bacon sont des plus appréciées. Le Landrace occupe une bonne position pour les performances de croissance et de carcasse. La viande issue du Landrace possède des qualités organoleptiques et technologiques comparables au Large White. Au Québec, le Landrace possède, à une fréquence de 5%, l'allèle de sensibilité à l'halothane (cf. paragraphe 4.3.1, p33) alors que le Landrace français en est exempt.

Les truies Landrace se distinguent par une excellente précocité sexuelle, de remarquables qualités maternelles et ont en moyenne 12,3 porcelets par portée. Cette truie contribue à placer l'élevage porcin français en tête des pays européens pour la prolificité. Le Landrace se place en 2^{ème} position au rang des races de porcs en France, après le Large White. Son introduction en France est due à une sélection orientée vers des porcs conformes aux exigences des milieux de production et du marché. La principale fonction du Landrace est de produire des truies F1 issues de croisements Large White x Landrace.

1.2.3- La race Duroc

Le Duroc est une ancienne race américaine caractérisée par une robe brun rouge (photo 1c). Il doit son intérêt à d'excellentes performances de croissance et d'engraissement mais il ne rivalise pas avec le Large White. La teneur en gras intramusculaire est assez élevée, mais l'absence du gène de sensibilité à l'halothane lui offre des qualités technologiques proches de celle de la race Large White.

En Europe, cette race intervient aussi bien comme composante de la truie parentale que comme partenaire du verrat terminal pour augmenter le taux de intramusculaire.

1.2.4- La race Piétrain

La race Piétrain tire son nom du village belge où elle est née. Le Piétrain est un porc de taille moyenne, de couleur blanche avec des taches noires (photo 1d). Il a des pattes plus courtes que les autres races, un dos assez large et un aspect trapu. Le Piétrain possède des jambons musclés et très développés et une viande maigre. Cette race est le leader incontesté des races modernes pour les performances de carcasses car il associe une teneur en muscle exceptionnelle à un rendement de carcasse remarquable. Le Piétrain se distingue également par une bonne efficacité alimentaire mais son faible appétit limite sa croissance. L'inconvénient majeur du Piétrain pur est qu'il est très fréquemment porteur homozygote des allèles de sensibilité à l'halothane. Par conséquent, les avantages que présente cette race pour les performances d'élevage sont en partie annulés par une moindre qualité des viandes chez une partie des animaux. Chez le Piétrain, l'acidification *post-mortem* du muscle est à la fois rapide et ample induisant une dégradation marquée de la viande et un faible rendement technologique. Par contre, les Piétrains hétérozygotes fournissent des viandes dont les qualités sont moins, mais cependant significativement influencées par la présence d'un seul allèle n. Par conséquent, les verrats sont souvent utilisés comme verrat terminal, afin de profiter des performances en élevage et de réduire les conséquences négatives sur les qualités des viandes. De nos jours, les croisements ont permis de créer des Piétrains ne portant pas l'allèle n afin de s'affranchir de l'effet négatif du statut hétérozygote sur les qualités des viandes.

Les truies de la race Piétrain sont réputées pour être de très bonnes mères. Cette race est principalement utilisée pour la production de verrats Piétrain x Large White. De ce fait, elle représente 25% des gènes des porcs charcutiers dans un grand nombre d'organisation de

sélection porcine. Dans quelques régions françaises, Nord ou Est, elle est utilisée comme verrat terminal en race pure pour satisfaire des débouchés locaux bien définis.

1.2.5- La race Meishan

Le Meishan a une robe noire avec l'extrémité des membres blanche. La peau est épaisse et plissée (photo 1e). Cette race, d'origine chinoise, présente une croissance relativement faible ; 8-10 mois pour atteindre 100 kg contre 5 à 6 mois pour les autres races. Elle présente également une mauvaise conformation et une carcasse très grasse mais elle offre une viande très appréciée pour sa tendreté et sa saveur. Les qualités technologiques des viandes sont identiques à celles des races européennes, mais les qualités organoleptiques sont supérieures de par la teneur élevée en lipides intramusculaires (Mourot and Kouba, 1999).

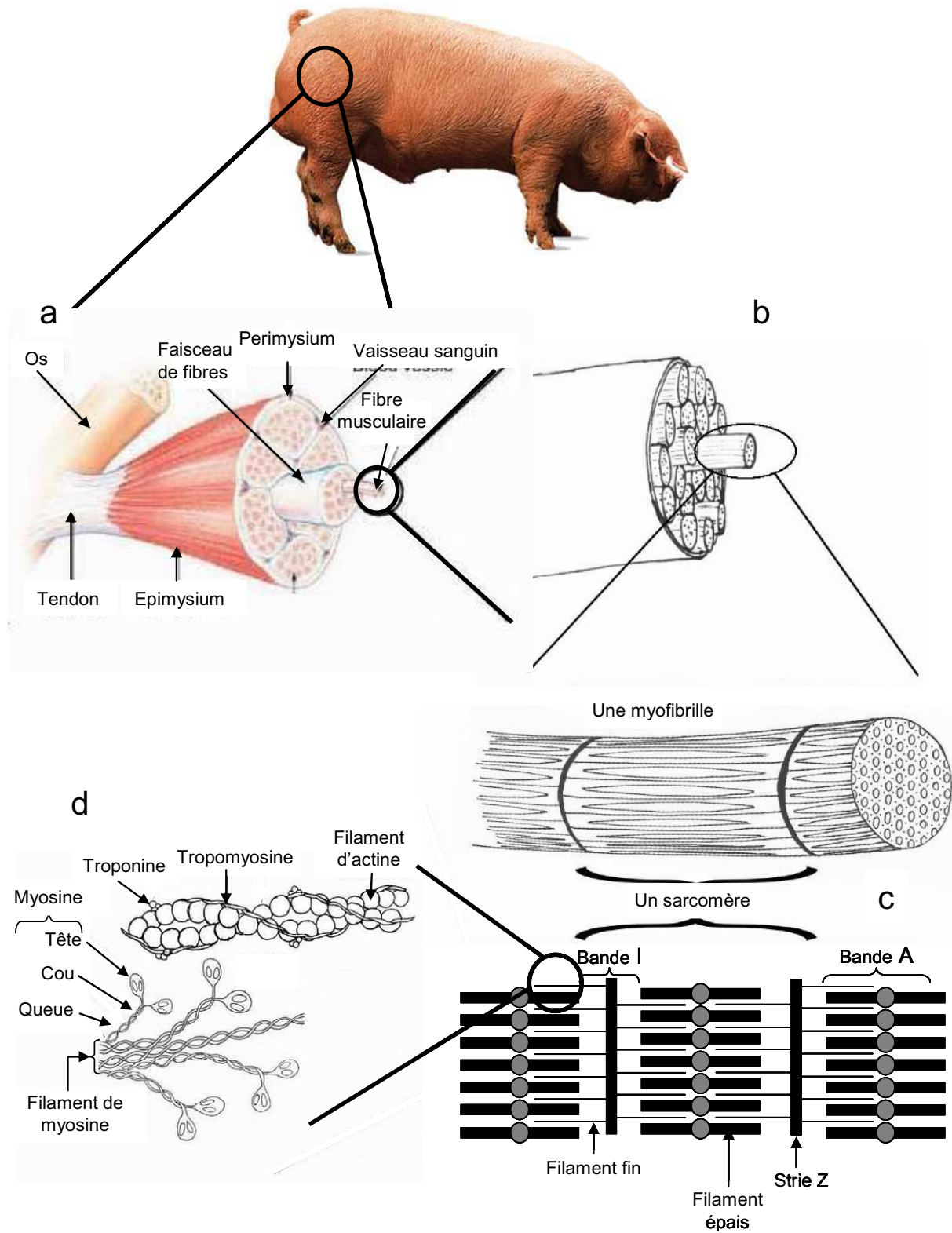
La truie de race Meishan est très prolifique car elle met bas de 14 à 18 porcelets par portée et possède de bonnes aptitudes maternelles au sens large ; production laitière, docilité, longévité et rusticité. La truie a ses premières chaleurs entre 2 et 4 mois, contre 6 à 7 mois pour les races européennes. Afin de valoriser les performances de reproduction exceptionnelles de cette race chinoise, la France l'a importée en 1979 pour la croiser avec des races européennes et améliorer la productivité de l'élevage français. La race Meishan est donc principalement utilisée en croisement.

1.3- Le marché du porc en 2006

Au niveau mondial, comme pour les années précédentes, la hausse d'environ 3% du cheptel mondial et de la production résulte de la progression de la production chinoise. Dans la plupart des principaux bassins de production, la Chine, l'Union Européenne à 25, les Etats-Unis et le Brésil, les évolutions ont été positives, mais modérées. La consommation de porc s'est accrue de 3,2%, plus particulièrement en Asie, suite à l'épizootie de la grippe aviaire. En 2006, Les principaux pays exportateurs, l'Union Européenne à 25 et le Canada ont diversifiés leurs destinations mais les principaux pays importateurs restent le Japon, les Etats-Unis et la Russie.

La production européenne de viande de porc s'est légèrement accrue en 2006 (+0,5%), fruit d'une hausse dans les pays de l'Est, notamment la Pologne (+4,4%).

Figure 1: Organisation et structure du muscle squelettique.



En France, pour la première fois depuis 1995, la production s'est stabilisée. En effet, la baisse du nombre de truies est tout juste compensée par une augmentation de la prolificité et du poids moyen. En 2006, les échanges de porcs vivants entre la France et les pays étrangers ont été particulièrement dynamiques avec un accroissement des exportations de 4,5% et des importations de 12%. Les importations des produits transformés sont également en progression (+5,1%).

En 2007, la rentabilité économique des élevages porcins est, en partie, déterminée par le prix des céréales, lequel est resté élevé en raison d'une augmentation de la demande mondiale. Les producteurs européens sont confrontés, d'une part à une baisse des prix à la production, conséquence d'une reprise de la production en Allemagne, Espagne, Italie et Pologne et d'autre part, au maintien du prix de l'aliment à un niveau élevé.

2- Le muscle : organisation et fonctionnement

Le système musculaire squelettique exerce un rôle fondamental dans l'organisme : il permet le déplacement, le maintien de la posture et dégage de la chaleur. La fonction principale du muscle squelettique est la production de force de mouvement, par un mécanisme spécifique : la contraction. Sa structure extrêmement organisée, de l'échelle de l'organe à l'échelle cellulaire, reflète cette fonction. Ce tissu représente en moyenne 40% du poids sec du corps. Il est sous le contrôle du système nerveux périphérique permettant le mouvement volontaire et est également sensible aux stimulations hormonales.

2.1- Structure

Le muscle est composé à 75% d'eau, il contient également de 19 à 25% de protéines, de 1 à 6% de lipides et de 1 à 2% de glucides et minéraux.

Le muscle est un tissu composite (Fig. 1a) qui renferme principalement les fibres musculaires mais également l'ensemble des tissus nécessaires au maintien de sa structure (le tissu conjonctif), à son alimentation en nutriments et en oxygène (le réseau vasculaire et le tissu adipeux) et à son contrôle (le tissu nerveux).

Les fibres musculaires, ou myofibrilles, correspondent aux entités cellulaires des muscles (Fig. 1b). Ces cellules, les plus longues de l'organisme après les cellules nerveuses, sont de forme cylindrique et plurinucléées. Elles sont issues de la fusion de plusieurs myoblastes. Chaque fibre musculaire renferme dans son sarcoplasme, c'est-à-dire le cytoplasme des cellules musculaires, des myofibrilles disposées parallèlement à l'axe longitudinal de la cellule. Ces myofibrilles, d'un diamètre de 1 à 2 μm et d'une longueur pouvant atteindre 30 cm chez l'homme, apparaissent au microscope optique comme une succession de bandes claires et de bandes sombres laissant penser à une striation d'où le nom de muscles striés (Fig. 1c). L'observation au microscope électronique fait apparaître une ligne sombre, la strie Z, qui partage la bande claire en 2 parties égales. Le sarcomère désigne la portion de myofibrilles comprise entre 2 stries Z et représente l'unité contractile de la cellule (Fig. 1c). La partie sombre du sarcomère, ou bande A, est constituée de filaments épais eux-mêmes composés d'éléments de 100 Å de diamètre, la myosine. La partie claire du sarcomère, ou bande I, est constituée, principalement, de filaments fins formés d'éléments de 50 Å de diamètre, l'actine (Fig. 1d).

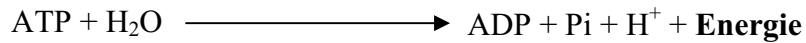
La myosine (Fig. 1d) est une molécule de grande taille constituée d'un assemblage de plusieurs chaînes polypeptidiques :

- Deux chaînes lourdes (MHC pour Myosin Heavy Chain) de 230 kDa portent l'activité ATPasique (Picard et al., 2003). Quatre isoformes de MHC peuvent être distinguées sur la base de leur vitesse d'hydrolyse de l'ATP et par conséquent sur la vitesse de contraction des sarcomères (Shiaffino and Reggiani, 1994).
- Quatre chaînes légères (MLC pour Myosin Light Chain) de 20 kDa sont composées d'une chaîne phosphorylable et de deux chaînes alcalines. Les chaînes légères sont impliquées dans les interactions myosine / actine (Wagner and Weeds, 1977) et régulent l'activité ATPasique des chaînes lourdes.

L'actine (Fig. 1d) joue un rôle structural dans toutes les cellules. Dans la cellule musculaire, elle est impliquée dans la contraction. Elle se présente sous forme d'une protéine globulaire, l'actine G, qui dans certaines conditions, se polymérise en filaments d'actine F. Deux filaments d'actine F s'associent en hélice qui peut interagir avec les têtes de myosine pour former les structures contractiles ou complexes d'actomyosine.

2.2- Métabolisme énergétique musculaire

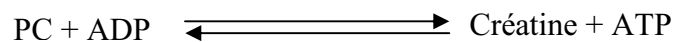
In vivo, la cellule musculaire obtient son énergie par hydrolyse de l'ATP :



Le taux d'ATP dans un muscle de porc au repos est d'environ 6-10 $\mu\text{mole/g}$ de muscle frais (Fernandez et al., 2002 ; Klont et Lambooy, 1995). Lors d'un exercice physique, ce taux diminuerait rapidement si l'ATP n'était pas régénéré à partir de 3 mécanismes principaux : la phosphocréatine, la myokinase et le glycogène (Bendall, 1973).

2.2.1- La phosphocréatine

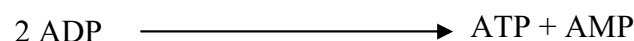
La phosphocréatine (PC) est la première source de régénération de l'ATP utilisée par le muscle. Elle est déphosphorylée par la créatine kinase (CK) pour synthétiser une molécule d'ATP et de la créatine selon la réaction suivante :



Le taux de PC étant d'environ 20 $\mu\text{mole/g}$ de muscle, cette source d'énergie est rapidement épuisée (Bendall, 1973).

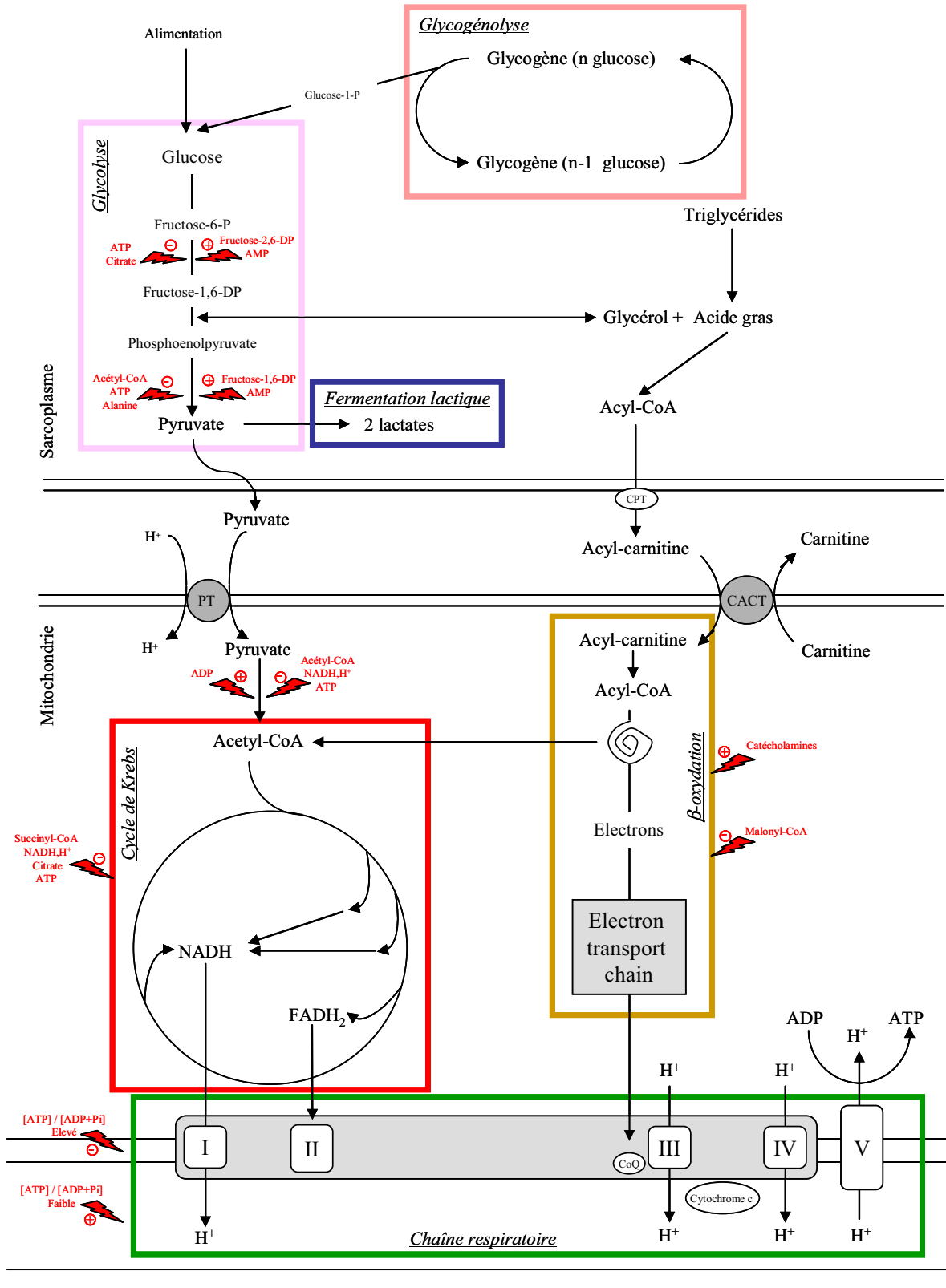
2.2.2- La myokinase

Cette enzyme, spécifique du muscle, permet de produire une molécule d'ATP à partir de 2 molécules d'ADP :



Cette voie ne représente que 10% de l'ATP régénéré total (Bendall, 1973).

Figure 2: Les différentes voies métaboliques de régénération de l'ATP dans la cellule.
 PT: Pyruvate Translocase, CACT: Carnitine Acyl-CoA Transférase



2.2.3- Le catabolisme du glycogène musculaire

La principale source d'énergie du muscle est le glucose qui provient soit du stock naturel de glucose du muscle, le glycogène, un gros polyholoside de poids moléculaire variable, soit de la circulation sanguine, issu de l'alimentation ou du stock de glycogène du foie. Dans le premier cas, avant d'entrer dans les voies de régénération de l'ATP, le glycogène est d'abord hydrolysé en glucose-1-phosphate par la voie de la glycogénolyse. Le glucose provenant du sang ou de la dégradation du glycogène, entre dans la voie de la glycolyse commune à l'ensemble des cellules de l'organisme. Puis, en fonction de l'équipement enzymatique et de l'oxygénation de la cellule, le produit de dégradation du glucose, le pyruvate, emprunte soit la voie de la phosphorylation oxydative, nécessitant un apport d'oxygène, soit la voie de la fermentation lactique, réalisée en absence d'oxygène.

a- La glycogénolyse

La glycogénolyse (Fig. 2) est l'ensemble des réactions qui conduit à la production de glucose-1-phosphate à partir de glycogène. La glycogène phosphorylase agit en enlevant, l'un après l'autre, à partir des extrémités non réductrices, les résidus glycosyls qu'elle libère sous forme de glucose-1-phosphate. Cette enzyme ne rompt que les liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$ et ne peut agir sur les liaisons de branchement $\alpha(1\rightarrow6)$ des ramifications. Par conséquent, la phosphorylase s'arrête à quatre résidus glycosyls de l'embranchement. La GDE (Glycogen debranching enzyme) élimine les ramifications permettant à la phosphorylase de terminer la dégradation. L'avantage de ce clivage phosphorolytique est la formation de glucose phosphaté sans consommation d'ATP.

b- La glycolyse

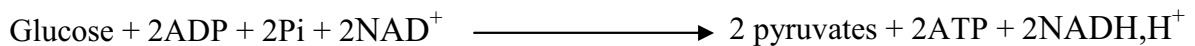
La glycolyse (Fig. 2) est un ensemble de réactions biochimiques qui permettent à une cellule d'extraire de l'énergie directement du glucose ou du glucose-1-phosphate sans utilisation d'oxygène. Cette chaîne de 10 réactions est d'une importance fondamentale en

biologie, d'une part parce qu'elle fonctionne en anaérobiose et d'autre part parce qu'elle fournit le pyruvate, un sucre en C3, dégradé par la suite dans le cycle de Krebs, ou transformé en lactate dans la voie fermentative.

La glycolyse se déroule entièrement dans le cytoplasme et est divisée en 2 grandes phases :

- La première phase permet la transformation du glucose, issu de l'alimentation ou du glycogène endogène, en un triose ; le glycéraldéhyde-3-phosphate avec consommation de 2 molécules d'ATP par molécule de glucose.
- La deuxième phase permet la synthèse de 4 ATP, 2 NADH,H⁺ et de 2 pyruvates par molécule de glucose.

D'où la réaction globale de la glycolyse suivante :



Les voies métaboliques sont régulées de deux façons différentes : soit en influant sur les quantités d'enzymes qui dépendent du taux de synthèse et de dégradation des enzymes, soit en influant sur l'activité enzymatique par régulation allostérique, par fixation non covalente d'un métabolite de la voie réactionnelle sur l'enzyme.

La glycolyse est principalement régulée, de façon allostérique, au niveau de 2 enzymes clés qui sont la phosphofructokinase I (PFK-1) et la pyruvate kinase (PK).

La phosphofructokinase 1 est l'élément le plus important dans le contrôle de la glycolyse :

- L'ATP et le citrate agissent comme des inhibiteurs
- L'AMP et le fructose-2,6-diphosphate (F-2,6-DP) agissent comme des activateurs.

La concentration en F-2,6-DP est donc primordiale pour contrôler l'activité de la glycolyse.

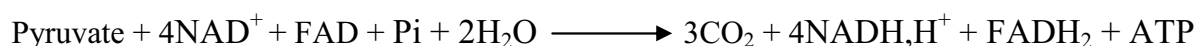
Les réactions de synthèse et de dégradation du F-2,6-DP sont catalysées par la phosphofructokinase-2 dont l'activité est différente selon son état de phosphorylation.

La pyruvate kinase est la deuxième enzyme permettant la régulation de la glycolyse.

- L'ATP, l'acétyl-CoA et l'alanine sont des inhibiteurs de la PK.
- L'AMP et le Fructose-1,6-diphosphate sont des activateurs de la PK.

c- La phosphorylation oxydative

Le pyruvate produit par la glycolyse dans le cytoplasme entre, grâce à la pyruvate translocase, dans la mitochondrie (Fig. 2). Là, il est transformé en acétyl-CoA, le premier substrat du cycle de Krebs, par la pyruvate déshydrogénase. Le bilan des réactions du cycle de Krebs est le suivant :



Le cycle de Krebs et la glycolyse fonctionnent de façon coordonnée de telle sorte que la vitesse de déroulement de la glycolyse permet de fournir les substrats nécessaires au cycle de Krebs.

La régulation du cycle de Krebs se fait soit directement sur le cycle lui-même :

- L'isocitrate déshydrogénase est inhibée par une accumulation de NADH,H^+ .
- La citrate synthase est bloquée par une accumulation d'ATP et de citrate.
- L' α -cétoglutarate déshydrogénase est inhibée par l'accumulation de NADH,H^+ , de succinyl-CoA et d'ATP.

soit en amont du cycle :

La pyruvate déshydrogénase est activée par une forte concentration en ADP et inhibée par des fortes concentrations en acétyl-CoA, NADH,H^+ et ATP.

Les coenzymes réduits, NADH,H^+ , formés lors de la glycolyse et du cycle de Krebs, et le FADH_2 , formé lors du cycle de Krebs, sont ensuite régénérés par oxydation dans la chaîne respiratoire (Fig. 2). Celle-ci est un ensemble de 4 complexes protéiques localisés dans la membrane interne des mitochondries. Elle est associée à 2 cofacteurs assurant la liaison entre les complexes. La chaîne respiratoire ne synthétise pas directement d'ATP, mais utilise l'énergie fournie par les coenzymes réduits pour créer un gradient de protons entre l'espace inter-membranaire et la lumière de la mitochondrie. L'ATP synthétase, une protéine de la membrane interne de la mitochondrie associée à la chaîne respiratoire, synthétise les molécules d'ATP en utilisant l'énergie de dissipation du gradient de protons.

Au total, 37 ATP (3 par la glycolyse et 34 par la chaîne respiratoire) sont synthétisés par dégradation d'une molécule de glucose en CO_2 et H_2O .

Le contrôle de l'activité de la chaîne respiratoire dépend de l'apport en NADH,H^+ , O_2 , ADP et P_i . Au repos, le rapport $[\text{ATP}] / [\text{ADP} + \text{P}_i]$ est élevé, la chaîne respiratoire fonctionne donc au ralenti. Durant un effort, ce rapport diminue rapidement, l'activité de la chaîne respiratoire augmente donc significativement (Balaban, 1990).

d- La fermentation

Certaines fibres musculaires, naturellement pauvres en mitochondries, dégradent moins le pyruvate par des voies aérobies de la phosphorylation oxydative. Même pour des fibres riches en mitochondries, un exercice musculaire intense peut réduire la quantité d'oxygène disponible dans le muscle diminuant sensiblement l'oxydation aérobie du pyruvate.

Dans ce cas, le NAD^+ indispensable à la glycolyse est alors régénéré grâce à la réduction du pyruvate en lactate (Fig. 2). Cette voie métabolique est peu rentable puisqu'elle ne permet de produire que 3 ATP à partir d'un glucose, mais elle a une cinétique de réaction élevée.

2.2.4- Les autres sources d'énergie

Après plusieurs dizaines de minutes d'un effort soutenu, les cellules musculaires empruntent généralement la voie de dégradation des acides gras saturés ou insaturés (Fig. 2). Ceux-ci proviennent soit directement de l'alimentation, soit des triglycérides de réserve. Ils sont transportés de l'intestin pour les premiers ou des adipocytes pour les seconds par le sang jusqu'aux organes cibles (ici le muscle). Dans le cytoplasme, les acides gras sont véhiculés jusqu'aux mitochondries par des protéines de transport ; FABP (Fatty acid binding protein). Au niveau de la membrane externe des mitochondries, les acides gras sont transformés en acyl-CoA par l'acyl-CoA synthétase et traversent la membrane interne des mitochondries par l'action de la carnitine acylcarnitine translocase. Dans la matrice mitochondriale, les acyl-CoA entrent dans la β -oxydation, ou hélice de l'ynen, fournissant des acétyl-CoA au cycle de Krebs et des coenzymes réduits à la chaîne respiratoire. Cette voie de dégradation exclusivement aérobie possède un rendement énergétique plus élevé que la phosphorylation oxydative. En effet, l'oxydation d'un acide gras à 16 carbones correspond à 7 tours de β -oxydation : 7 FADH_2 (14 ATP) + 7 NADH,H^+ (21 ATP) + 8 Acétyl-CoA (96 ATP) soit au

Tableau 1 : Classification des fibres musculaires adaptée de Brooke and Kaiser (1970) et Peter et al. (1972).

Type de fibres				
Classification adaptée de Brooke and Kaiser (1970)	I	IIA	IIX	IIB
Peter et al. (1972)	Lente oxydative	Rapide oxydo-glycolytique	Rapide oxydo-glycolytique	Rapide glycolytique
Physiologie				
Vitesse de contraction	Faible	Elevée	Elevée	Elevée
Résistance à la fatigue	Elevée	Intermédiaire	Intermédiaire	Faible
Morphologie				
Couleur	Rouge	Rouge	Rouge	Blanche
Teneur en myoglobine	Elevée	Elevée	Elevée	Faible
Teneur en mitochondrie	Elevée	Elevée	Elevée	Faible
Métabolisme énergétique				
Teneur en glycogène	Faible	Elevée	Elevée	Elevée
Teneur en lipides	Elevée	Elevée	Elevée	Faible
ATPase myofibrillaire	Faible	Elevée	Elevée	Elevée
Teneur en GAPDH	Faible	Intermédiaire	Intermédiaire	Elevée
Teneur en SDH	Elevée	Intermédiaire	Intermédiaire	Faible

Vigneron et al. (1983)

final 129 ATP en tenant compte de l'activation de l'acide gras. En équivalent pour 16 carbones, l'oxydation du glucose fournit 101 ATP.

La β -oxydation des acides gras est régulée à deux niveaux :

- Le malonyl-CoA, un intermédiaire de la lipogénèse, inhibe l'acylcarnitine transférase, empêchant l'entrée des acyl-CoA dans la mitochondrie, donc le fonctionnement de l'hélice de l'ynen.
- Les catécholamines, adrénaline et noradrénaline, dont la concentration augmente lors d'un exercice physique, activent la β -oxydation.

En période de jeûne poussé, les cellules musculaires utilisent la dégradation des protéines comme source d'énergie. En effet, quand l'effort musculaire se prolonge au-delà des réserves énergétiques, le muscle peut utiliser certains acides aminés pour se fournir en énergie. Les protéines sont dégradées en acides aminés qui entrent par la suite dans les voies métaboliques. La valine, l'isoleucine et la leucine sont transformées en acétyl-CoA pour entrer dans le cycle de Krebs. Ils fournissent respectivement 32, 42 et 43 moles d'ATP par mole d'acides aminés. L'alanine, la valine et l'isoleucine entrent dans la néoglucogénèse par le cycle de Feilig et fournissent donc du glucose.

2.3- Les types de fibres musculaires

Dès 1874, Ranvier observa des différences dans les muscles squelettiques. Il distingua les muscles rouges, des muscles blancs en se basant sur la teneur en myoglobine, un pigment rouge permettant le transport de l'oxygène dans la cellule musculaire. En 1970, Brooke et Kaiser décrivent une méthode basée sur la détermination de l'activité ATPasique des fibres, après une pré-incubation à pH 4,35, afin de les classer selon leur vitesse de contraction (Tableau 1). Cette activité, située au niveau des chaînes lourdes de myosine, permet l'hydrolyse de l'ATP pour fournir de l'énergie lors de la contraction musculaire. Cette méthode a permis de distinguer 3 types de chaînes lourdes de myosine, donc 3 types de fibres : I, IIA et IIB (Barany, 1967 ; Burke et al., 1973). En 1972, Peter et al. ont combiné la classification par l'activité ATPasique avec le type métabolique qui se base sur les différences d'équipements enzymatiques des fibres musculaires donc de l'importance relative des différentes voies métaboliques de régénération de l'ATP. De nos jours, plusieurs

classifications basées sur la révélation des propriétés contractiles et/ou métaboliques ont été établies.

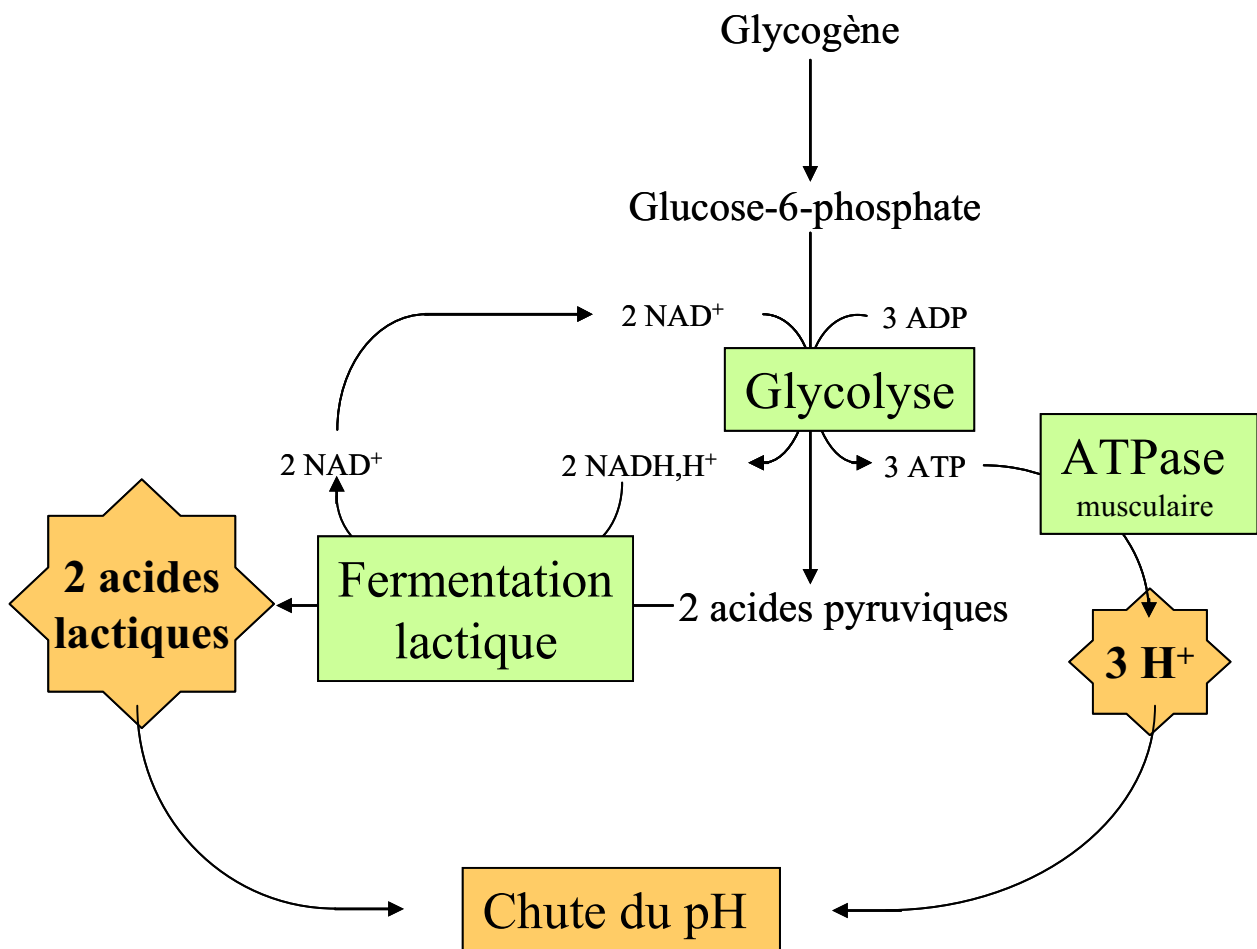
En se basant sur leurs propriétés enzymatiques et contractiles, deux types de fibres sont distinguables dans le muscle squelettique.

Les fibres musculaires de type I ou lentes oxydatives utilisent principalement le métabolisme oxydatif pour la fourniture d'énergie (Brooke et Kaiser, 1970). Elles sont caractérisées par l'activité importante de la succinate déshydrogénase (SDH), une enzyme mitochondriale du cycle de Krebs, ainsi qu'une forte teneur en myoglobine, d'où leur nom usuel de « fibres rouges » (Essen-Gustavsson et al., 1990). Ces fibres possèdent de nombreuses mitochondries et une teneur élevée en triglycérides permettant un renouvellement de l'ATP par la voie de la phosphorylation oxydative. Leur rendement énergétique élevé leur confère une bonne résistance à la fatigue. Incubées dans un milieu acide, les fibres de type I conservent leur activité ATPasique alors qu'elle est inhibée par une incubation en milieu alcalin.

La plupart des fibres musculaires de type II utilisent principalement le métabolisme glycolytique pour la synthèse d'énergie. A la différence des fibres de type I, l'activité ATPasique des fibres de type II reste stable dans un milieu alcalin. En milieu acide, leur activité est variable permettant la différenciation de trois sous-groupes : IIA, IIB et IIC (Brooke et Kaiser, 1970).

- Les fibres de type IIA ou rapides oxydo-glycolytiques se colorent après une pré-incubation à pH 4,8 alors que pour un pH plus acide elles perdent leur coloration. Physiologiquement, elles sont caractérisées par une vitesse de contraction rapide et résistent à la fatigue (Garnett et al., 1978).
- Les fibres de type IIB ou rapides glycolytiques se colorent après une pré-incubation à pH 4,6 mais ne se teignent pas à des pH inférieurs. Elles sont caractérisées par l'activité importante de la lactate déshydrogénase, une enzyme cytoplasmique de la fermentation anaérobie, une forte teneur en glycogène et une faible teneur en myoglobine, expliquant leur aspect de « fibres blanches ». Le renouvellement de l'ATP s'effectuant principalement par la voie de la fermentation lactique anaérobie, leur rendement énergétique médiocre explique en partie leur faible résistance à la fatigue.
- Les fibres de type IIC se colorent de façon variable selon le pH du milieu ; certaines se colorent fortement à pH 4,35 mais peu à pH 10,8, inversement, certaines se colorent à pH 10,8 et peu à pH 4,35 enfin certaines ont une réponse intermédiaire (Brooke et Kaiser, 1970). La capacité oxydative des fibres de type IIC est similaire aux fibres de type I et leur capacité glycolytique est comparable aux fibres de type IIA (Jansson, 1975).

Figure 3: Mécanisme post-mortem d'acidification du muscle.



(Monin, 1988)

- Les fibres de type IIX possèdent une activité ATPasique similaire aux fibres de type IIB. L'activité de la succinate déshydrogénase des fibres IIX est supérieure aux fibres IIB et inférieure aux fibres de type IIA (Lefaucheur et Ecolan, 1998).

3- Du muscle à la viande

3.1- Evolution post-mortem des propriétés biochimiques

Après la saignée, les cellules musculaires continuent de fonctionner afin de maintenir leur homéostasie. L'arrêt de la circulation sanguine stoppe l'apport en oxygène et en nutriments. Le métabolisme de régénération de l'ATP s'oriente alors vers la dégradation du glycogène par les mécanismes anaérobies ; glycolyse et fermentation lactique (Monin, 1988). Les métabolites produits, protons et acide lactique, ne pouvant plus être éliminés par le sang, s'accumulent dans la cellule et entraînent une diminution du pH musculaire (Bendall, 1973) (Fig.3). Une fois les réserves en glycogène épuisées ou après disparition de l'AMP, les réactions s'arrêtent, stabilisant le pH à une valeur appelée pH ultime (pHu), qui chez le porc est généralement comprise entre 5,4 et 7 (Monin, 1988). Dans la mesure où l'ensemble des enzymes cellulaires fonctionne de façon optimale au pH physiologique (pH 7), l'acidification du pH cellulaire influencera fortement les réactions enzymatiques cellulaires et par conséquent les caractéristiques qualitatives de la viande.

3.2- Evolution post-mortem des propriétés mécaniques

Chez l'animal vivant, l'ATP permet aux filaments épais et aux filaments fins, constituant l'appareil contractile, de glisser les uns par rapport aux autres donnant au muscle ses propriétés d'extensibilité et d'élasticité. La myosine et l'actine du complexe actomyosine ne se dissocient que si une nouvelle molécule d'ATP se fixe sur la tête de myosine. Après la mort, le taux cellulaire d'ATP diminue. Lorsque celui-ci atteint environ les 50% de la teneur du muscle au repos, les têtes de myosine restent irréversiblement liées à l'actine, rendant le glissement relatif des filaments impossible et l'ensemble de l'appareil contractile se transforme en un système rigide : le muscle devient inextensible. Le muscle entre ainsi en

rigidité cadavérique ou *rigor mortis* (Bendall, 1973 ; Monin, 2003). Cette rigidité est perceptible sur les carcasses dans les heures qui suivent la mort de l'animal. Elle est complète lorsque les réserves en glycogène et/ou en AMP de la cellule sont épuisées rendant impossible le renouvellement de l'ATP. Par la suite, la rigidité musculaire s'estompe progressivement mais pas l'inextensibilité. La diminution de la rigidité est principalement due à la lyse des protéines myofibrillaires sous l'effet des protéases endogènes conduisant ainsi à une augmentation progressive de la tendreté du muscle, c'est la maturation. Les systèmes protéolytiques impliqués dans le processus d'attendrissage des viandes sont les mêmes que ceux qui, du vivant de l'animal, assurent le turn-over protéique (Ashgar et Bhatta, 1987).

Deux systèmes enzymatiques sont principalement impliqués dans le processus :

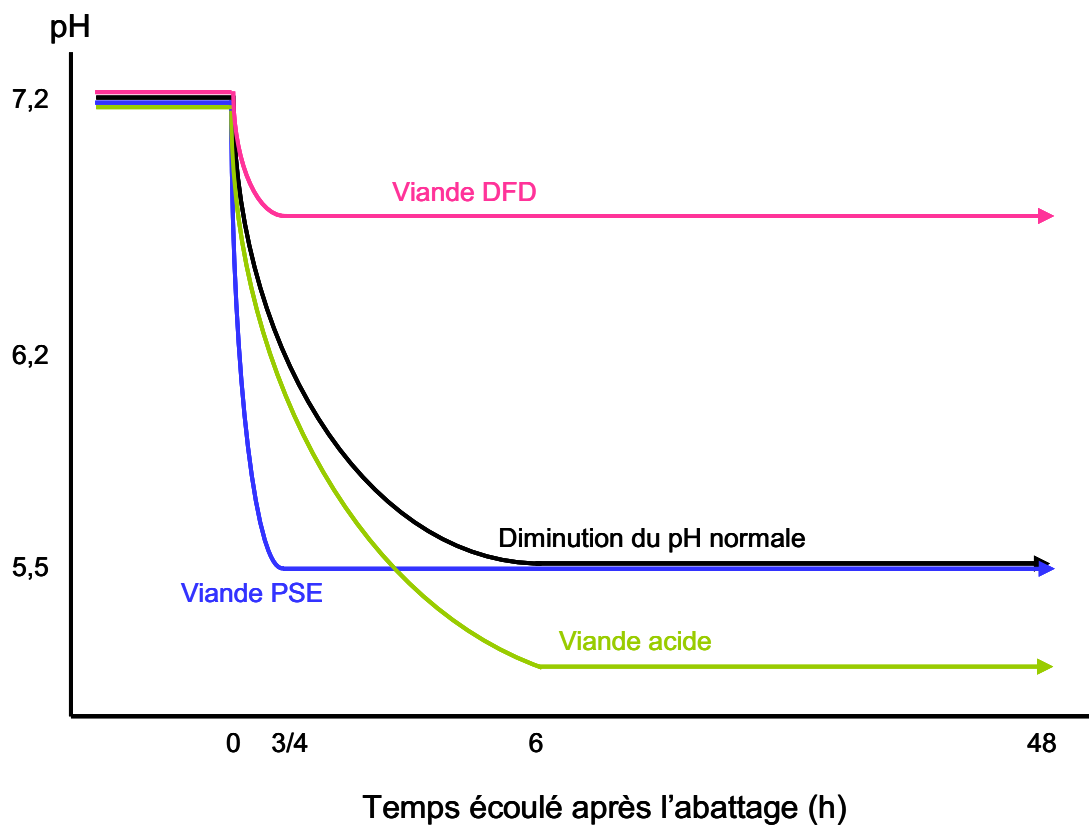
- Les calpaïnes : in vivo, les calpaïnes sont impliquées dans le turn-over des protéines myofibrillaires même si elles ne semblent pas dégrader les deux protéines myofibrillaires majeures, l'actine et la myosine. Cependant, des expériences in vitro ont démontré une dégradation de la strie Z par les calpaïnes (Busch et al., 1972). Après la mort, la désorganisation de la strie Z est la principale modification structurale observée au cours de l'attendrissage (Taylor et al., 1995 ; Ouali et al., 1983).
- Les cathepsines : in vivo, le rôle des cathepsines est pour l'instant très mal connu. Généralement, on leur attribue un rôle dans la dégradation des protéines lors de leur renouvellement (Fernandez et Sainz, 1997). Grâce à des études in vitro, il a été démontré que les cathepsines fragmentent les myofibrilles au niveau de la bande I, de la bande M et de la jonction entre les bandes A et I (Mikami et al., 1987 ; Ouali, 1992). Elles seraient ainsi impliquées dans l'attendrissage de la viande.

On peut également citer l'intervention du protéasome et on évoque également depuis peu l'intervention des systèmes enzymatiques impliqués dans l'apoptose, les caspases (Sentandreu et al., 2002 ; Herrera-Mendez et al., 2006).

4- Les critères de qualités des viandes

Les qualités des viandes de porc sont variables et dépendent de nombreux facteurs en amont, comme le mode d'élevage, le type génétique, les conditions d'abattage et le stress à l'abattage. Elles sont classées en deux grands ensembles : les qualités technologiques, qui possèdent un intérêt principalement pour la filière, et les qualités sensorielles et

Figure 4: Evolution de la diminution du pH *post-mortem*



(Monin, 1988)

nutritionnelles, qui ont un impact important dans le choix et/ou la satisfaction du consommateur.

4.1- Les qualités technologiques

Les qualités technologiques des viandes caractérisent leurs aptitudes à la conservation et à la transformation. On peut en distinguer 4 ; l'acidification du muscle, le pouvoir de rétention d'eau, le rendement de transformation et le rendement de tranchage. Mon étude n'ayant pas porté sur les produits issus de la transformation de la viande de porc, seul le pH *post-mortem* et le pouvoir de rétention d'eau seront développés en tant que qualités technologiques.

4.1.1- Le pH *post-mortem*

(Voir paragraphe 3.1 : « évolution *post-mortem* des propriétés biochimiques »)

Après l'abattage, l'énergie est apportée aux cellules musculaires par des réactions anaérobies productrices de protons et d'acide lactique. Ces réactions induisent une diminution du pH. Celle-ci est caractérisée par sa vitesse et par son amplitude. La vitesse est influencée par de nombreux facteurs comme l'espèce étudiée, la composition en fibres du muscle, l'état de stress juste avant l'abattage qui influence l'activité cellulaire *ante-mortem* et la température du muscle. L'amplitude est directement liée aux réserves de glycogène du muscle à l'abattage.

a- La vitesse de diminution du pH

La vitesse de diminution du pH *post-mortem* est directement proportionnelle à l'activité ATPasique. Tous les facteurs modifiant cette activité entraînent un changement similaire de la vitesse de diminution du pH (Bendall, 1973). Chez le porc, le pH ultime est normalement atteint au bout de 6 à 8 heures *post-mortem*. Cependant cette durée est variable et dépend de l'espèce, de l'activité cellulaire *ante-mortem* et du muscle étudié (Fig. 4).

L'accélération de la diminution du pH est due à l'activation du métabolisme de dégradation du glycogène avant la mort et à son maintien *post-mortem* (Monin, 1988)

Deux facteurs en sont la cause :

- l'état de stress. L'état de stress est un état physiologique, comportemental et psychologique de l'animal face à une situation perçue comme menaçante (Terlouw, 2002). L'état psychologique des animaux, donc l'état de stress, ne peut être qu'estimé par les mesures comportementales et physiologiques car nous manquons d'indicateurs directs. Les mesures comportementales concernent généralement les réponses d'adaptation à la situation (fuite, agressions, immobilisation, explorations...). Les mesures physiologiques se basent sur les taux sanguins de cortisol (principal glucocorticoïde chez de nombreuses espèces) et sur l'activité du système nerveux autonome ortho- et para-sympathique en mesurant l'activité cardiaque ou le taux sanguin ou urinaire de catécholamines (adrénaline et noradrénaline). Ce dernier reflète l'équilibre entre les effets opposés de l'ortho- et du para-sympathique. L'interprétation de ces mesures, en terme de stress est parfois difficile car les variations se produisent également en dehors d'un état de stress, simplement suite à une activité physique ou à une vigilance accrue de la part de l'animal (Terlouw, 2002).
- l'activité physique de l'animal juste avant l'abattage. L'activité physique avant l'abattage regroupe les déplacements des animaux lors du transport jusqu'au site d'abattage (chargement, déchargement, conduite au poste d'abattage) et également les réponses comportementales liées à l'état de stress. Concrètement pendant la période de pré-abattage (transport, attente à l'abattoir), une activité physique accrue diminue les réserves en glycogène du muscle et ce d'autant plus si elle est associée à un état de stress. Selon le muscle, cette diminution peut se traduire par un pH ultime plus élevé et une couleur plus sombre. Une activité physique élevée et/ou un état de stress important entraînent une augmentation de la température du muscle. Cette température, couplée à un pH *post-mortem* bas entraînent une dénaturation des protéines pouvant conduire à des viandes avec un pouvoir de rétention d'eau réduit (Monin, 1988 ; Terlouw et al., 1997 ; D'Souza et al., 1999)

Dans certains cas, la vitesse de diminution du pH est rapide (Fig. 4), le pH_u peut-être atteint en une dizaine de minutes dans les cas les plus extrêmes entraînant l'apparition de viandes dites PSE, de l'anglais Pale (pale), Soft (mou), Exsudative (exsudative). Ces viandes sont caractérisées par une couleur très claire, un mauvais pouvoir de rétention d'eau et une tendreté altérée.

b- L'amplitude de la diminution du pH

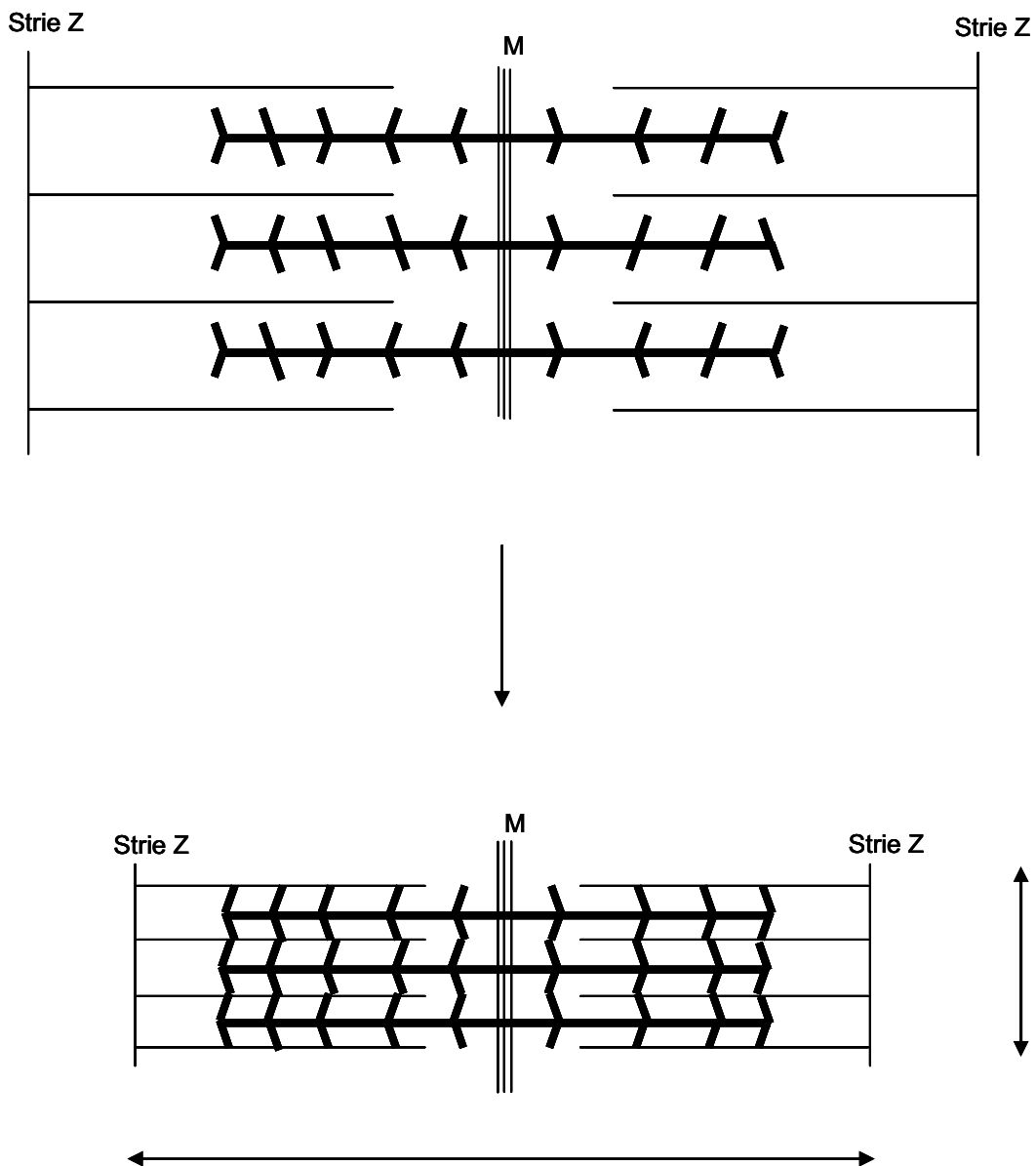
L'amplitude de la diminution du pH *post-mortem* détermine la valeur du pH ultime. Elle dépend pour une grande partie des réserves en glycogène du muscle, plus celles-ci sont importantes, plus la valeur du pH ultime sera faible. La glycolyse dans le muscle *post-mortem* cesse :

- Soit par disparition de l'adénosine monophosphate (AMP), nécessaire comme cofacteur des enzymes de la glycolyse et de la glycolyse. Le pH se stabilise alors à des valeurs variables en fonction des muscles (5,4 à 5,7 chez le porc) avec parfois la présence d'une quantité importante de glycogène résiduel (Monin, 2003).
- Soit par carence en glycogène. Dans ce cas, le pH se stabilise à des valeurs plus élevées que précédemment (jusqu'à 7 dans les cas extrêmes) (Monin, 2003).
- Soit par inactivation des enzymes de la glycolyse et de la glycolyse sous l'effet de la diminution du pH.

Il existe 2 grands types de défauts de qualités des viandes liés à l'amplitude de diminution du pH (Fig. 4) :

- Les viandes DFD, de l'anglais Dark (sombre), Firm (ferme), Dry (sèche) (Bendall, 1973 ; Fernandez et al., 1992), sont caractérisées par un pH ultime anormalement élevé, supérieur à 6. Ce défaut est lié à un taux de glycogène musculaire faible au moment de l'abattage. Dans la période de pré-abattage, les animaux sont soumis à différents stimuli provoquant un « stress » et une activité physique accrue donc une demande en énergie plus importante d'où une consommation plus ou moins importante des réserves en glycogène du muscle (Monin, 1988 ; Terlouw, 2001). Ces viandes apparaissent sombres, donc peu attractives pour le consommateur. De plus, les pH élevés favorisent le développement de microorganismes altérant la viande et nuisant ainsi à leur conservation. Cependant, ces viandes sont recherchées, dans une certaine mesure, dans la fabrication de produits salés ou séchés car les modifications de leurs structures protéiques favorisent la pénétration du sel lors du saumurage ou la dessiccation (Larzul et al., 2006).
- Les viandes « acides » sont caractérisées par un pH ultime anormalement bas, inférieur d'environ 2 à 3 dixièmes aux valeurs normales (Naveau, 1986) (Fig. 4). Ce défaut est généralement lié à un défaut génétique (sur le gène RN ; cf. paragraphe 4.3.1, p33) qui conduit à des taux anormalement élevés de glycogène musculaire (Monin, 1989 ; Fernandez et al., 1992 ; Estrade et al., 1993 ; Larzul et al., 1998). De nos jours, la sélection

Figure 5: La contraction musculaire entraîne une contraction longitudinale et transversale.



(Diesbourg et al., 1988)

des animaux non porteurs de ce défaut a permis l'élimination de la mutation et donc la quasi disparition de ce type de viande défectueuse.

4.1.2- Le pouvoir de rétention d'eau

Le pouvoir de rétention d'eau est important pour la filière viande car il entre en grande partie dans la satisfaction du consommateur (Ngapo et al, 2004; Dransfield et al., 2003 ; Carpentier et al., 2003). En effet, il influence l'aspect du produit cru, les pertes en eau à la décongélation ou à la cuisson et l'exsudation lors de la conservation. Pour la viande porcine, les pertes en poids varient de 1 à 3 % du poids initial, allant jusqu'à 10 % pour les viandes PSE (Offer et Knight, 1988 ; Melody et al., 2004). La perte en eau consécutive aux exsudations diminue le poids commercialisable et la jutosité de la viande et est associée à une perte de protéines, jusqu'à 112 mg/ml d'exsudat (Savage et al., 1990).

Le muscle contient approximativement 75% d'eau. L'eau est une molécule bipolaire (chargée électriquement) attirée par les molécules également chargées comme les protéines. Dans le muscle, l'eau existe sous trois fractions :

- L'eau liée : cette fraction est proche des molécules chargées, possède une mobilité réduite et ne congèle pas à 0°C. L'eau liée représente environ 10 % du poids du muscle. Cette quantité reste stable pendant la *rigor mortis*. (Offer et Knight, 1988).
- L'eau immobilisée ou piégée : cette fraction ne quitte pas le muscle après l'abattage à cause des effets stériques et de l'attraction par l'eau liée. Cependant elle peut être congelée ou éliminée par les procédures de refroidissement ou de séchage. Un changement de la structure de la cellule et/ou la dégradation des protéines, entraînent une libération de cette fraction (Offer et Knight, 1988).
- L'eau libre : cette fraction se déplace librement et est maintenue dans la viande par des forces de surface faibles. L'eau libre est généralement formée après la *rigor mortis*, quand le changement de conditions entraîne la libération de l'eau piégée (Fennema, 1985).

L'exsudat est donc majoritairement formé à partir d'eau initialement piégée (Offer et Knight, 1988). L'eau d'abord expulsée de l'espace myofibrillaire est par la suite expulsée de la cellule. Le mécanisme se compose de deux étapes. Le rétrécissement latéral et longitudinal des myofibrilles constitue la première étape (fig. 5). Pendant la transformation du muscle en viande, le pH peut atteindre le point isoélectrique de la myosine (5,4) qui possède autant de

charges positives que négatives. Les charges opposées s'attirent alors mutuellement diminuant la distance entre les filaments épais de 2,5nm (Diesbourg et al., 1988) (Fig. 5). L'eau est d'abord expulsée dans le sarcoplasme puis vers l'espace extramyofibrillaire (Offer et Knight, 1988 ; Lahucky et al., 1997). Le transfert du rétrécissement des myofibrilles à la membrane cellulaire constitue la seconde étape. Pendant l'installation de la *rigor mortis*, le diamètre des cellules musculaires diminue. Les myofibrilles sont connectées entre elles et à la membrane cellulaire par des liens protéiques, les costamères (desmine, filamine, dystrophine, taline, vinculine et intégrine ; (Lawson, 2004) qui *post-mortem* transmettent le rétrécissement des myofibrilles à la membrane cellulaire. Ce rétrécissement est à l'origine de la formation de canaux qui conduisent l'exsudat vers l'extérieur du muscle (Offer et Cousins, 1992 ; Melody et al. 2004).

La quantité d'exsudat dépend de la charge nette des protéines myofibrillaires, du degré de maintien de la structure interne de la cellule musculaire (les liens entre les protéines structurales et les membranes) et des propriétés des membranes. Une forte dégradation des liens protéiques entre les myofibrilles et la membrane cellulaire résulte en un moindre transfert des rétrécissements myofibrillaires sur la cellule musculaire, donc à moins d'exsudat. La dégradation de ces protéines se fait en partie par l'activité protéolytique de la μ -calpaine et des cathepsines (Gardner et al., 2005 ; Lawson, 2004). L'activation de la μ -calpaine nécessite des concentrations en calcium de l'ordre de 10 μ M et est régulée par son inhibiteur compétitif la calpastatine (Koohmaraie, 1992). D'autres facteurs pourraient influencer la protéolyse. Les changements dans le pH, les forces ioniques et l'oxydation des protéines peuvent altérer la conformation du substrat et le rendre moins sensible aux clivages par la μ -calpaine ou encore altérer la conformation de l'enzyme (Huff-Lonergan et Lonergan, 2005). Enfin, la perméabilité et la fluidité des membranes pourraient jouer un rôle dans l'exsudation de la viande.

4.2- Les qualités sensorielles

Les qualités sensorielles de la viande regroupent l'ensemble des critères pouvant être appréciés par les sens humains (toucher, saveur, odorat, aspect). On peut en distinguer 4 : la couleur, la tendreté, la jutosité et la flaveur (non mesurée dans cette étude).

4.2.1- La couleur

La couleur est l'un des premiers critères de choix pour le consommateur. A l'abattage, la viande apparaît translucide et de couleur foncée (plus ou moins selon la teneur en pigment, de l'animal et du muscle considéré). Au fur et à mesure du déroulement des réactions *post-mortem*, la viande devient opaque et pâle. La couleur est caractérisée par la luminosité (L^*), qui mesure le pouvoir d'absorption de la lumière par la viande, par l'intensité de la couleur rouge (a^*) et par l'intensité de la couleur jaune (b^*).

La coloration de la viande est principalement due à la quantité et à la forme de la myoglobine dans les cellules musculaires alors que la luminosité dépend principalement de la structure des myofibrilles. La myoglobine est un pigment hémunique, il possède un atome de fer dont l'état d'oxydation varie avec la quantité d'oxygène présent dans la cellule. Les trois formes de myoglobine sont définies par le degré d'oxygénation et d'oxydation de celle-ci, la désoxymyoglobine (Fe^{2+}), l'oxymyoglobine (Fe^{2+} mais la myoglobine est liée à un atome d'oxygène) et la metmyoglobine (Fe^{3+}) (Lindahl et al., 2001). Les proportions relatives de ces trois formes de myoglobines influencent la couleur de la viande : une couleur rouge vif est liée à la présence d'oxymyoglobine, la désoxymyoglobine donne une couleur rouge pourpre et la metmyoglobine est associée à une couleur grise/brune peu attirante pour le consommateur. L'influence de la structure des myofibrilles sur la luminosité de la viande est liée d'une part, à la présence d'eau qui crée une surface très réfléchissante, elle donne une apparence claire à la viande et d'autre part, à l'espacement entre les myofibrilles. Des myofibrilles rapprochées absorbent plus la lumière impliquant une couleur sombre alors que lorsqu'elles sont éloignées, de l'eau s'insinue dans l'espace libre (Mac Dougall, 1970, 1982) et forme une surface réfléchissante impliquant une couleur claire.

4.2.2- La tendreté

La tendreté est définie comme la facilité avec laquelle la viande est découpée puis broyée lors de la mastication. C'est la qualité la plus appréciée et la plus recherchée par le consommateur, principalement pour la viande bovine. La dureté de base dépend de la teneur du muscle en collagène et son degré de réticulation, c'est-à-dire le nombre et la nature des liaisons formées entre le collagène et l'élastine. Seul un traitement mécanique ou thermique permet de réduire efficacement la dureté liée au collagène. Comme décrit dans le paragraphe

« Evolution post-mortem des propriétés mécaniques », la tendreté de la viande dépend fortement des modifications *post-mortem* qui affectent principalement le compartiment myofibrillaire. En effet, la structure myofibrillaire est profondément remaniée sous l'action d'enzymes protéolytiques endogènes (Ouali, 1991).

Cependant d'autres phénomènes sont à prendre en compte.

- Après l'abattage et lorsque la position du muscle dans la carcasse le permet, l'installation de la *rigor mortis* s'accompagne d'un raccourcissement longitudinal du muscle dont l'amplitude dépend de la température (Locker and Hagyard, 1963 ; Bendall, 1973). En effet, en présence d'une quantité suffisante d'ATP, les basses températures induisent une forte contracture appelée contracture au froid (Locker and Hagyard, 1963). Cette contracture influence de façon négative la tendreté de la viande mais seulement jusqu'à une contraction de 40%. Au dessus, la tendreté s'améliore grâce à une altération de la structure des sarcomères (Davey et al., 1967). La dureté myofibrillaire est à relier à la contracture, mais celle-ci est fortement atténuée par l'altération enzymatique des protéines au cours de la maturation.
- La vitesse du métabolisme *post-mortem* affecte également la tendreté de la viande de porc. En effet, les viandes PSE, dont le métabolisme *post-mortem* est rapide, sont plus dures que les viandes dites « normales » (Minelli et al., 1995 ; Estrade et al., 1991). En effet, chez les animaux présentant des viandes PSE, le taux de dégradation de la structure myofibrillaire est réduit, probablement à cause d'une diminution de la sensibilité de cette structure à la protéolyse. L'altération du système calpaïnes/calpastatine chez les animaux sensibles à l'halothane, et en particulier une diminution de l'activité de la calpaïne, serait à l'origine de la moindre dégradation du compartiment myofibrillaire lors de la maturation de la viande chez les animaux ayant une vitesse de chute du pH musculaire importante (Minelli et al., 1995).
- Le pH_u influence de façon non linéaire la tendreté de la viande. En effet, chez le porc, la viande est plus dure quand le pH_u est situé entre 5,4 et 6 (valeurs normales du pH_u), que pour des valeurs supérieures (Lewis et al., 1987 ; Van Der Wal et al., 1988 ; Jeremiah et al., 1990). Ceci s'explique, en partie, par la réduction de l'activité enzymatique des calpaïnes pour les pH inférieurs à 6.

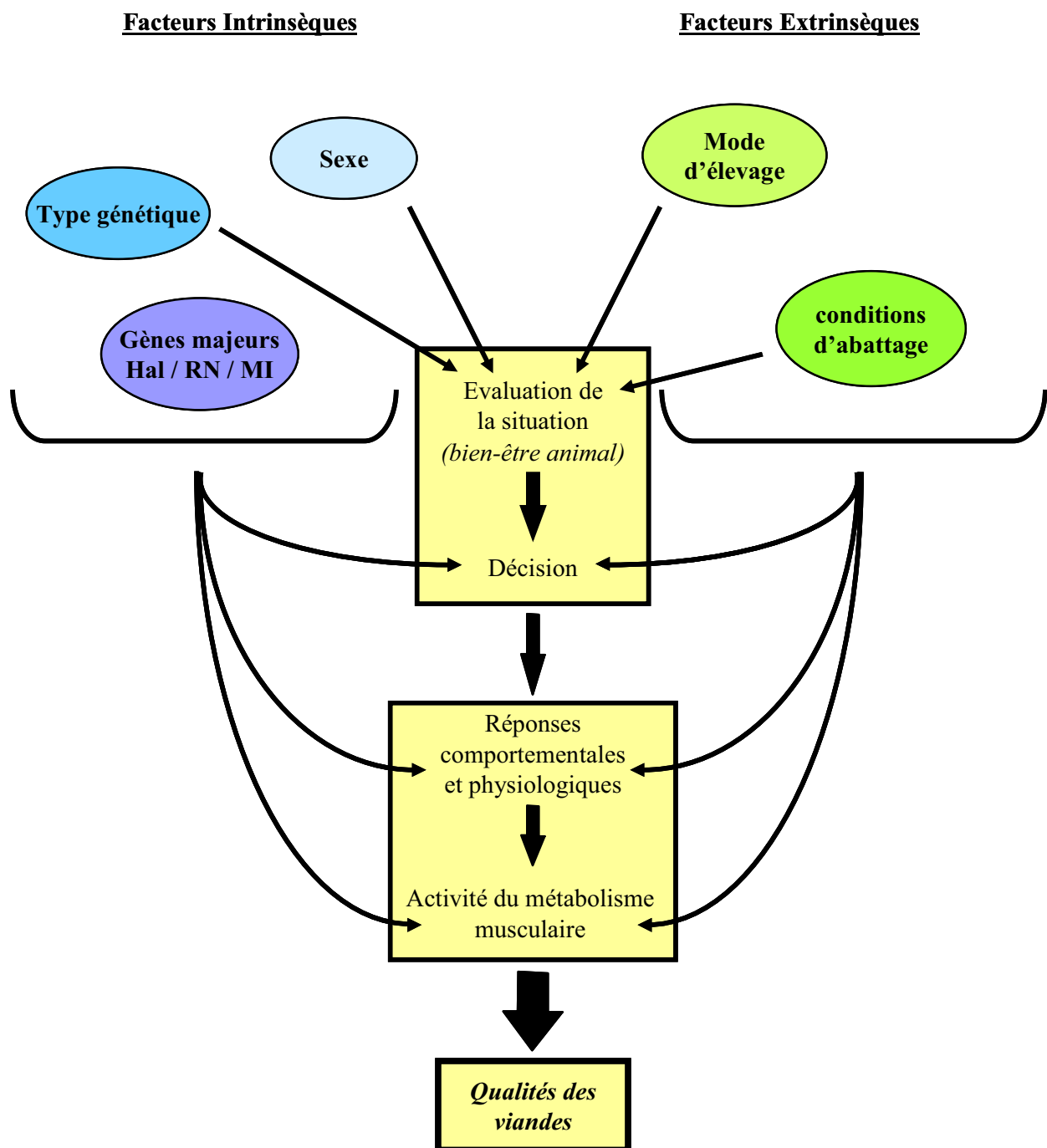


Figure 6: Facteurs intrinsèques et extrinsèques possédant un effet direct ou indirect sur les qualités des viandes.

4.2.3- La jutosité

Il est généralement admis que la sensation de jutosité fait intervenir deux composantes (Lawrie, 1966). La première impression est déterminée par la quantité d'eau libérée en début de la mastication. Elle est directement dépendante du pouvoir de rétention d'eau de la viande. La seconde résulte de la stimulation de la salive par les lipides. Cette dernière laisse une impression plus durable que la première (Eikelenboom and Hoving-Bolink, 1997).

Les modalités de transformations biochimiques du muscle de porc *post-mortem* jouent un rôle primordial dans le déterminisme des qualités technologiques et sensorielles de la viande. Elles sont l'aboutissement d'un ensemble complexe de facteurs développés dans le prochain paragraphe.

4.3- Les facteurs de variation des qualités de viande

Même si de nombreux facteurs intrinsèques, type génétique et sexe, et extrinsèques, type d'élevage et abattage, influencent particulièrement les qualités de viande (Fig. 6), celles-ci varient même au sein d'un groupe d'animaux issus d'une même lignée et d'un même élevage.

4.3.1- Les facteurs intrinsèques

a- Les gènes majeurs

On connaît deux gènes majeurs influençant la qualité de la viande porcine : le gène de sensibilité à l'halothane et le gène des viandes acides (Sellier and Monin, 1994).

- Le gène de sensibilité à l'halothane est autosomal récessif, désigné Hal^S (ou Halⁿ ou n), le gène normal étant Hal^N ou N. Les animaux homozygotes NN et hétérozygotes Nn sont de phénotype normal, c'est-à-dire résistants à l'halothane, tandis que les homozygotes nn sont sensibles à l'halothane. Ce gène est responsable du développement du syndrome d'hyperthermie maligne (SHM) lorsque l'animal est contraint d'inhaler de l'halothane (un

anesthésique volatile d'usage courant) (Ollivier et al., 1976). Ce syndrome se caractérise par une augmentation de la température corporelle, une rigidité de l'ensemble des muscles et une acidose métabolique. Le gène de sensibilité à l'halothane code pour le récepteur à la rhyanodine, un canal calcique impliqué dans la libération du Ca^{2+} dans le sarcoplasme à partir du réticulum endoplasmique. Dans le cas de la sensibilité à l'halothane, la mutation entraîne une augmentation de la probabilité d'ouverture du canal. Ainsi en réponse à une stimulation donnée, il y a un relargage excessif de calcium dans le sarcoplasme qui entraîne une hydrolyse anormalement élevée d'ATP. Lorsque la stimulation intervient durant la vie de l'animal (stress du transport par exemple), l'hydrolyse excessive d'ATP est à l'origine du SHM pouvant aboutir à la mort de l'animal. Lorsque la stimulation intervient juste avant l'abattage, la consommation excessive d'ATP se traduit par une accélération de la diminution du pH *post-mortem* associée à une température élevée. Les porcs nn meurent subitement lors de stress et peuvent fournir des viandes PSE (Eikelenboom and Minkema, 1974).

La présence d'un allèle n chez l'animal possède un effet positif sur la conformation et la composition de la carcasse (Youssao et al., 2002). L'allèle n est favorisé par la sélection pratiquée en faveur du développement musculaire, du fait de son effet positif sur cet important caractère de production. De plus, il ne semble pas que le gène de sensibilité à l'halothane soit complètement récessif pour les qualités des viandes car les animaux hétérozygotes présentent le plus souvent des qualités des viandes intermédiaires (Sellier, 1998).

- Les viandes acides sont associées au gène RN présent sous la forme de deux allèles, RN^- (dominant) et rn^+ (normal et récessif) provenant de la race Hampshire (Le Roy et al., 1990). La mutation causale a été identifiée dans le gène PRKAG3 codant pour une protéine intervenant dans la régulation d'une protéine kinase (AMPK), elle-même impliquée dans la biosynthèse du glycogène (Milan et al., 2000). Cette mutation entraîne une hyperaccumulation de glycogène dans les fibres musculaires, qui se traduit par une amplitude trop importante de la diminution du pH *post-mortem*. Les viandes issues des animaux porteurs du gène RN^- sont acides, pâles, moins tendres et possèdent un faible pouvoir de rétention d'eau, mais leur flaveur est plus importante (Le Roy et al., 1990).
- Enfin, le gène MI, qui contrôle le taux de gras intramusculaire peut également être cité. Janss et al. (1994, 1997) ont observé un taux de gras de 3,9% chez les porcs homozygotes pour l'allèle récessif du gène MI contre 1,8% chez les autres génotypes. Les effets de ce

gène sur les qualités technologiques et sensorielles de la viande ne sont pas encore connus, mais on peut s'attendre à une influence favorable sur la tendreté et la jutosité.

b- Le type génétique

Le choix d'un type génétique par les éleveurs permet de répondre, d'une part, à des critères de production variables ; rusticité, prolificité, précocité, efficacité alimentaire, conformation de la carcasse, d'autre part, aux critères de choix du consommateur ; sécurité alimentaire et viande goûteuse (<http://www.agrisalon.com/06-actu/article-19718.php>). Ainsi, les croisements sont souvent les plus adaptés pour répondre aux contraintes du marché.

Les porcs charcutiers sont généralement issus de croisements. La race Large White, utilisée en élevage pour ses performances de reproduction, de croissance et ses qualités maternelles, présente une moins bonne conformation de carcasse que la race Landrace, utilisée en élevage pour sa précocité sexuelle. Leur croisement est le type génétique le plus utilisé dans la production française car il fournit des truies combinant les caractéristiques des deux races. La race Duroc est fréquemment utilisée en croisement terminal car il donne un porc de boucherie supérieur. Les verrats de race Piétrain sont utilisés en croisements terminaux car ils fournissent une musculature exceptionnelle et un rendement de carcasse élevé. Toutefois le gène de sensibilité à l'halothane est fortement ancré dans cette race et limite son intérêt mais en croisement son effet est diminué (cf. paragraphe 4.3.1, p33).

Le type génétique influence la composition des muscles. Par exemple, Alfonso et al. (2005) ont montré un taux de lipides intramusculaires plus élevé chez les porcs Basque et Duroc par rapport aux porcs de race Large White. De même, la composition des différents types de fibres pour un muscle donné et la teneur en glycogène musculaire est dépendante de la race (Lefaucheur, 2003 ; Müller et al., 2002 ; Monin et al., 1987). Par exemple, les porcs de race Duroc ont un taux de glycogène plus élevé que les porcs Large White (Terlouw et al., 1997).

Le type génétique influence également les réponses comportementales à divers stimuli. Certaines races sont par exemple plus réactives que d'autres à un stimulus donné. Il a été montré que les porcs de race Duroc et les porcs de races Large White réagissent différemment à la présence de l'Homme (Terlouw et Rybarczyk, 2008). De même, les porcs de race Large White explorent plus longtemps un objet non familier introduit dans leur loge que les porcs Piétrain (Terlouw et al., 2001).

Une partie de la variabilité des qualités des viandes observée entre les races est expliquée par des différences de réactivité aux procédures d'abattage (Terlouw et Rybarczyk, 2008) qui est à relier aux différences de réactivité entre les races. Ainsi, la génétique, peut influencer la façon dont les changements physiologiques se répercutent dans le muscle. Par exemple, le métabolisme *post-mortem* des muscles de porcs Duroc est moins affecté par le stress d'abattage que celui des porcs Large White malgré une réactivité au stress similaire (Terlouw, 2002). L'exemple le plus connu est l'influence du gène de sensibilité à l'halothane favorisant l'apparition de viande PSE. La réactivité au stress dépend également du mode d'élevage.

c- Le sexe

Les qualités technologiques et sensorielles sont peu influencées par le sexe des animaux. Par exemple, Latorre et al. (2004) n'observent pas de différences significatives ni dans la teneur en lipides, l'humidité, la couleur, la teneur en myoglobine ni dans la perte en eau à la décongélation entre des mâles castrés et de jeunes femelles. De même, la comparaison entre des mâles entiers, des mâles castrés et des femelles ne laisse apparaître qu'une influence mineure du sexe sur les qualités et le goût de la viande (Jeremiah et al., 1999). Cependant, les mâles entiers, c'est-à-dire non castrés, sont souvent écartés de la production de viande porcine à cause de l'odeur désagréable de leur viande.

4.3.2- Les facteurs extrinsèques

a- Le mode d'élevage

La production de porcs à l'extérieur constitue une alternative à l'élevage conventionnel en bâtiment. En effet, leurs viandes bénéficient d'une meilleure image auprès du consommateur qui l'assimile à un bien-être supérieur. Ce mode d'élevage, offrant un plus grand espace aux animaux, entraîne des modifications comportementales, physiologiques et métaboliques induites par l'activité physique, le rapport de l'animal avec son environnement, et les conditions climatiques (Chevillon et al., 2005). Par exemple, Gentry et al. (2004) ont montré que le système de production des porcs en extérieur favorisait la prise de poids et une orientation vers des fibres oxydatives. La viande apparaît plus rouge donc plus attractive pour le consommateur. Du point de vue comportemental, les animaux élevés en extérieur ont une

réponse comportementale et physiologique différente devant une situation inconnue de celle de porcs élevés en intérieur. En effet, ils ont un comportement plus calme durant le transport et/ou le mélange avant l'abattage car ils ont été élevés sur une aire riche en stimuli (Warriss et al., 1983, Terlouw et al., 2006). Les animaux les moins réactifs durant l'élevage auront probablement une moindre réactivité au stress de l'abattage (Terlouw, 2002).

Toutefois, il n'apparaît pas d'améliorations significatives des qualités de viande (Gandemer et al., 1990) sauf au niveau du gras sous cutané ou de la couleur (Warriss et al., 1983) chez des animaux élevés en extérieur. Au contraire, l'élevage en plein air aurait un effet négatif sur les qualités sensorielles, tendreté et jutosité, comparé à l'élevage confiné (Enfält et al., 1997). De même, Lebret et al. (1999) ont remarqué que les jambons secs issus de porcs élevés en semi plein air avaient une couleur moins homogène que ceux issus de porcs élevés en intérieur. Mais en 2006, Lebret et al. ont observé une carcasse plus grasse et une viande plus juteuse lorsque les porcs sont élevés sur de la sciure de bois avec un accès à l'extérieur vis-à-vis de ceux élevés de façon conventionnelle. Les avantages et les inconvénients du mode d'élevage alternatif dépendent donc en grande partie des études réalisées ainsi que de la variabilité des qualités des viandes observée selon les saisons.

Les modes d'élevage alternatifs ne semblent donc pas présenter d'avantages significatifs pour la production de viande de meilleure qualité. De plus, les contraintes liées à l'élevage alternatif réclament l'adaptation des élevages : surfaces, bâtiments, mais également l'utilisation de races plus rustiques qui résisteraient aux conditions climatiques (Edwards, 2005).

b- Les stress liés à l'abattage

En général 12 à 24 h avant l'abattage, les porcs sont privés de nourriture. Puis, à partir du moment où l'animal quitte le site d'élevage jusqu'à ce qu'il soit abattu, il subit différentes étapes potentiellement stressantes qui influencent le métabolisme musculaire et par conséquent les qualités des viandes.

- Le transport : les trois événements les plus stressants pour les animaux, durant le transport, sont le rassemblement sur le quai de chargement dans un enclos inconnu, le chargement et le déchargement de la bétailière (Warriss, 1987 ; Trunkfield and Broom, 1990 ; Knowles, 1995). Lorsque les transporteurs sont munis d'équipements adaptés, le chargement et le déchargement s'effectuent de façon fluide limitant ainsi le stress. Mais

même dans de bonnes conditions, ces manipulations nécessitent un effort physique. L'animal étant en situation de jeûne, la demande en énergie implique la diminution des réserves en glycogène. Lorsqu'il est réalisé dans de bonnes conditions : limitations des changements de vitesse brutaux et température ambiante adaptée, le transport permet aux porcs de se calmer et même de se reposer. Dans ce cas, la durée du transport n'influence pas les réponses physiologiques ou métaboliques (Hambrecht et al., 2005 ; Pérez et al., 2002), mais Bradshaw et al. (1996) et Brown et al. (1998) ont observé que la détérioration des qualités des viandes augmente avec la durée du transport.

- L'attente et le mélange avant l'abattage : arrivés à l'abattoir, les animaux ne sont pas immédiatement abattus mais hébergés pour une durée de 3 à 18 heures dans des cases d'attente contenant entre 15 et parfois jusqu'à 50 porcs d'un même élevage et privé de nourriture. Le mélange d'animaux inconnus donne lieu à des agressions impliquant une diminution des réserves en glycogène donc un pH ultime élevé (Fernandez et al., 1994). De plus, la privation de nourriture accentue l'agressivité des animaux (Barton-Gade et al., 1989 ; Fernandez et al., 1994). Si l'attente se prolonge et que la privation de nourriture n'est pas trop importante, l'attente peut être assimilée à un repos (Pérez et al., 2002). Il est à noter qu'il a été observé une agressivité moindre des porcs élevés en extérieur durant cette phase (Terlouw et al., 2006 ; Barton-Gade et al., 2004).
- La conduite au poste d'étourdissement : elle est souvent accompagnée de bousculades, d'excitation, de manipulations par l'Homme et de nouvelles expériences pour l'animal (tapis roulant, conduite suspendue). Les réponses comportementales et physiologiques à ces événements sont différentes en fonction de la réactivité des animaux. Ainsi, les porcs de race Large White, s'approchant plus facilement de l'Homme dans des tests effectués au cours de l'élevage, montrent des signes de stress ou d'activité physique moindres juste avant l'abattage (Terlouw et Rybarczyk, 2008). Cependant, Hemsworth et al. (2002) ont montré que les porcs les moins peureux montraient des signes de stress ou d'activité physique élevés, peut-être parce que, étant moins peureux envers l'Homme, ils étaient situés en queue de file et recevaient plus de sollicitations pour faire avancer le groupe. Ces manipulations induisent une élévation du métabolisme musculaire (Griot et al., 2000) et peuvent conduire à l'apparition de viande PSE.
- L'étourdissement : pour les animaux de boucherie, l'étourdissement, avant la saignée, est une obligation réglementaire pour le respect du bien être animal. L'étourdissement électrique ou électronarcose est la méthode principalement utilisée en France. Elle consiste à appliquer un courant électrique sur les tempes de l'animal ce qui a pour

avantage de l'étourdir en moins d'une seconde. L'utilisation de cette technique nécessite la séparation des porcs en file indienne contrariant leur instinct grégaire. Ainsi, à l'entrée du *restrainer*, deux tapis roulants légèrement inclinés ou un tapis central portant les porcs jusqu'aux électrodes, les animaux se chevauchent, et/ou se griffent. Le courant électrique appliqué provoque une violente contraction de la musculature. Il peut s'accompagner d'une activation du métabolisme et d'une augmentation de la température pouvant induire la formation de viande PSE (Van der Wal, 1975 ; Monin, 1973) ainsi que l'apparition de microhémorragies donnant un mauvais aspect à la viande (Griot et al., 2000). Enfin, si les électrodes sont mal positionnées ou si l'intensité du courant est inadaptée, l'électronarcose peut ne pas étourdir l'animal ou être douloureuse (Wotton et O'Callaghan, 2002). L'étourdissement gazeux, beaucoup utilisé dans les pays nordiques, est une alternative à l'électronarcose. Il consiste à immerger les animaux, soit individuellement soit en groupe, dans une fosse remplie de CO₂ à 80%. Cette méthode réduit la fréquence d'apparition des défauts d'aspect et des viandes PSE (Velarde et al., 2001 ; Channon et al., 2003). Toutefois, cette méthode suscite des interrogations quant au respect du bien-être animal car il a été observé chez le porc une excitation comportementale et des signes de souffrance respiratoire pendant la phase d'induction (Deiss et al, 2006). Cependant, encore faut-il savoir si les animaux perdent connaissance avant ou après les signes de détresse.

LE PROTEOME ET LE TRANSCRIPTOME :
DEFINITIONS ET METHODES D'ETUDE

Au centre du métabolisme musculaire, se trouvent les protéines, qui constituent en premier lieu une cible de modifications chimiques ou structurales mais également les médiateurs des réactions biochimiques par l'intermédiaire des enzymes, inhibiteurs et protéines régulatrices. Les protéines étant le reflet de l'information génétique, il est possible, en prenant en compte l'expression des gènes ainsi que le niveau intracellulaire des protéines et leur fonction biologique, de formuler des hypothèses sur la façon dont elles interagissent et de proposer des mécanismes explicatifs sur l'origine d'une particularité qualitative de la viande

Ainsi, la prochaine partie du manuscrit sera consacrée au protéome puis au transcriptome : leurs définitions, leurs synthèses, leurs régulations et les méthodes choisies dans mon travail pour les étudier.

1- Le protéome

1.1- Définition

Les informations issues de l'étude du transcriptome ne sont pas suffisantes pour analyser l'expression génique d'une cellule. En effet, avant le décryptage du génome humain, les différences entre les cellules étaient expliquées par l'hypothèse « d'allumage » et « d'extinction » de certains gènes sur les 100000 ou 120000 estimés. Aujourd'hui, à la vue des 30000 gènes humains trouvés, on estime que ce sont vraisemblablement les quantités de protéines, issues des différences dans l'expression des gènes, présentes dans une cellule donnée et leurs activités, modulées et régulées par des modifications post-traductionnelles, qui la différencient des autres cellules. La quantité de chaque protéine varie dans le temps, selon l'environnement et l'organe. Elle est caractéristique d'un état physiologique donné. Ainsi, le protéome représente l'ensemble des protéines issues du transcriptome d'un groupe cellulaire donné, à un instant donné et dans un état physiologique donné.

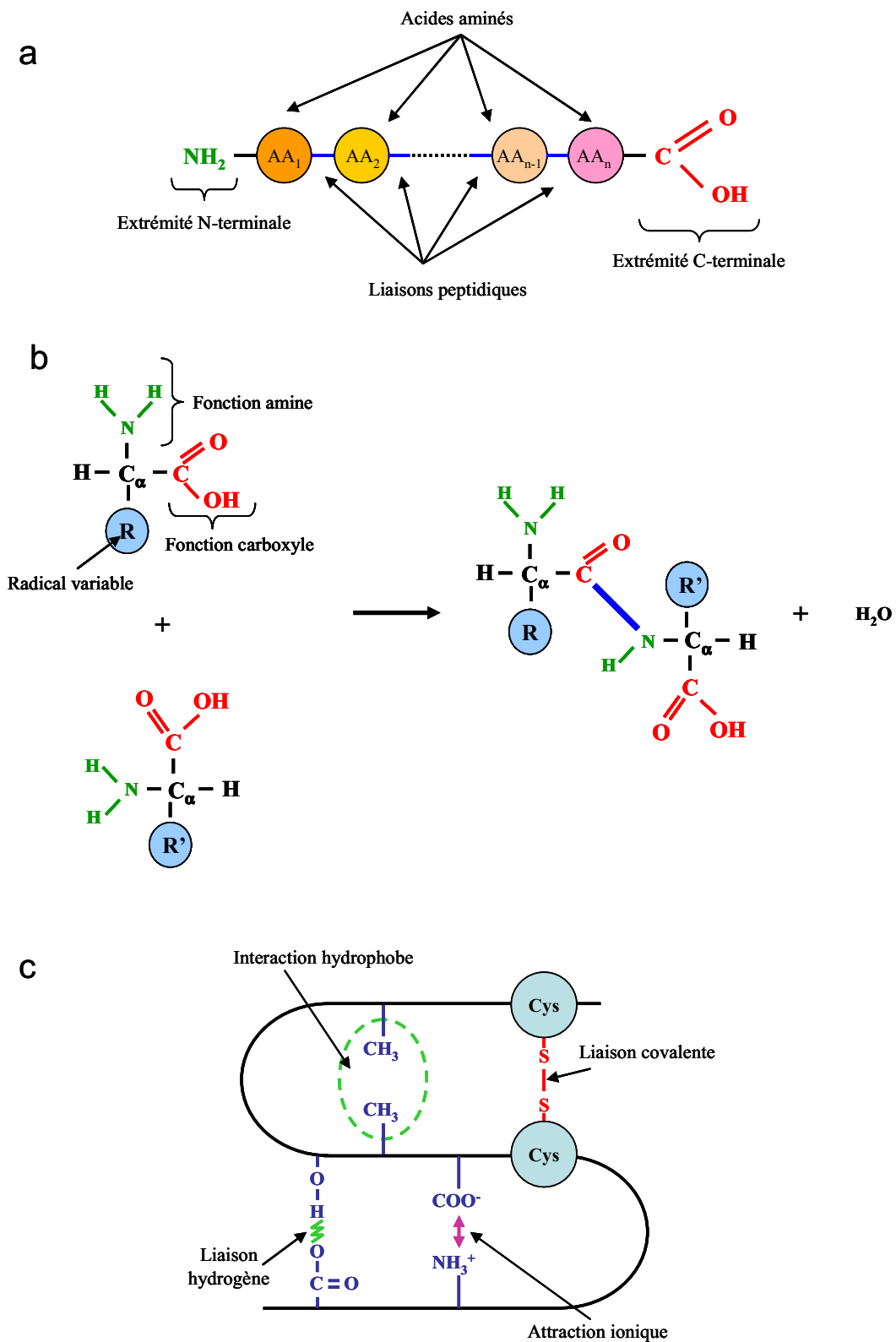


Figure 7: a- Organisation des protéines.

b- Structure des acides aminés et formation d'une liaison peptidique.

c- Les interactions intrachaîne permettant la stabilisation de la structure tridimensionnelle d'une protéine.

1.2- La structure des protéines

Les protéines (Fig.7a), découvertes par le néerlandais Gerhard Mulder à la fin du XIX^e siècle, représentent de 50 à 80% de la matière sèche d'un « être vivant » et sont les principaux acteurs cellulaires. Une protéine est une macromolécule constituée d'une séquence d'acides aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques. En général, le nom protéine désigne une chaîne de plus de 100 acides aminés, dans le cas contraire, les termes peptides et polypeptides sont utilisés. L'enchaînement des acides aminés est codé par le génome, il est caractéristique de chaque protéine et constitue la structure primaire. Les 20 acides aminés (Fig. 8) pouvant entrer dans la composition des protéines possèdent une structure commune (Fig. 7b). Le carbone, nommé α , porte la fonction carboxyle ; $-\text{COOH}$, la fonction amine ; $-\text{NH}_2$ et un radical différent pour chaque acide aminé. Les radicaux possèdent des propriétés électrochimiques différentes selon leur composition. Les radicaux non chargés à pH 7 sont soit apolaires soit polaires. Les radicaux apolaires (comme chez la méthionine, la valine, l'isoleucine, etc.) sont hydrophobes car constitués uniquement d'atomes de carbones et d'hydrogènes. Les radicaux polaires possèdent une fonction $-\text{OH}$ (sérine, thréonine, tyrosine), $-\text{SH}$ (cystéine) ou $-\text{CO}-\text{NH}_2$ (glutamine ou asparagine) pouvant former des liaisons hydrogènes avec l'eau. A pH 7, les radicaux sont soit chargés négativement (aspartate ou glutamate) soit positivement (arginine, lysine et histidine). Ces radicaux sont donc polaires et possèdent une forte réactivité. La liaison peptidique (Fig. 7b) est une liaison amide, c'est-à-dire une condensation entre la fonction carboxyle de l'acide aminé (n) et la fonction amine de l'acide aminé (n+1). C'est une liaison très stable ($84 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) et plane.

La structure tridimensionnelle, ou structure tertiaire, des protéines leur confère leurs fonctions. Elle est stabilisée par des liaisons intrachânes et par des interactions entre les polypeptides et l'environnement mais dépend toujours des caractéristiques du radical des acides aminés :

- Les interactions entre les radicaux d'acides aminés (Fig. 7c) : il en existe 4 types. 1) Les liaisons covalentes sont le plus souvent des ponts disulfures se formant entre les résidus soufrés des radicaux de deux cystéines, mais il existe également des ponts phosphodiester. 2) Les liaisons ioniques se forment entre des radicaux possédant des charges électriques opposées. 3) Les liaisons hydrogènes se forment entre deux radicaux

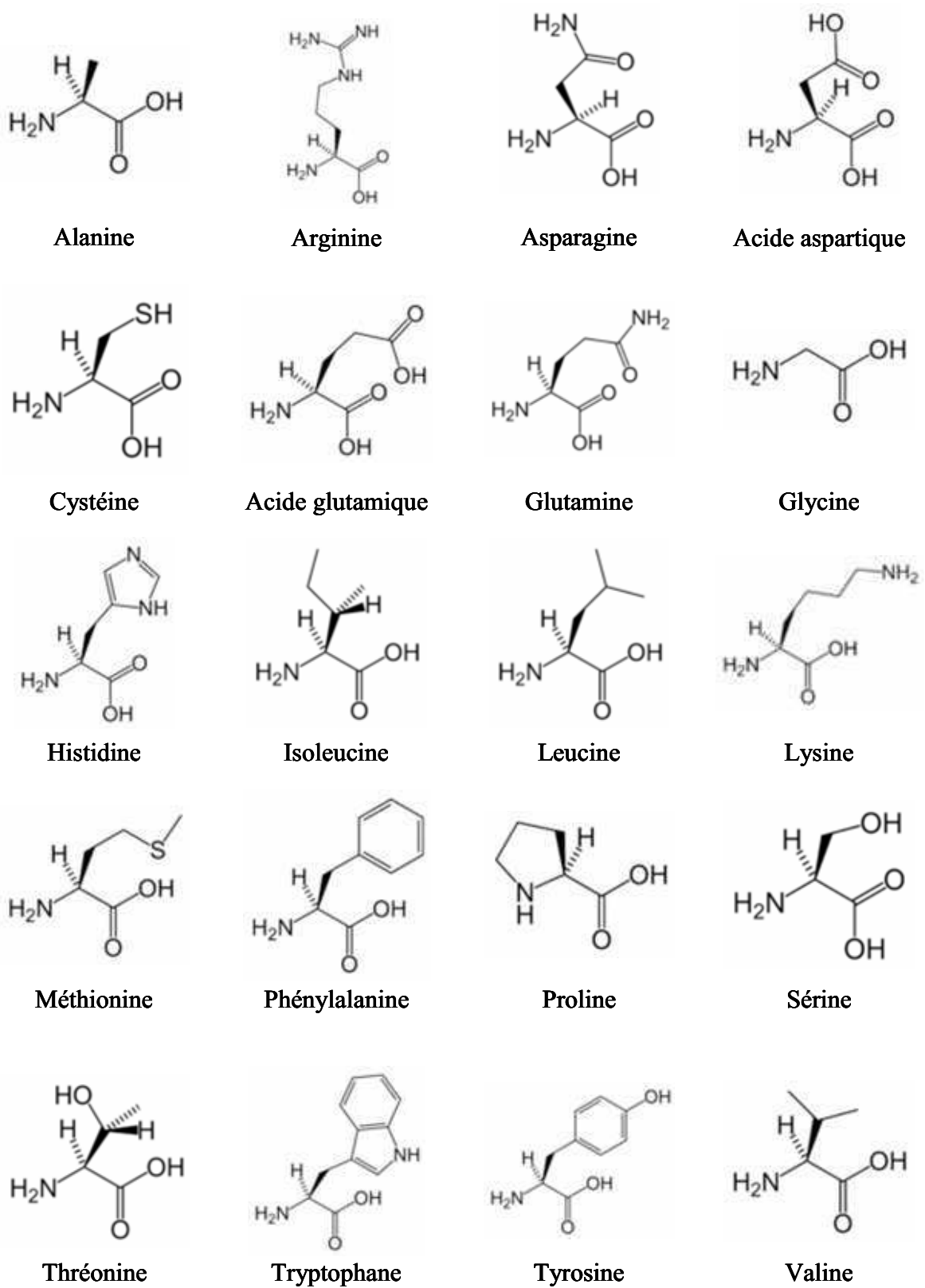


Figure 8: Les 20 acides aminés constitutifs des protéines.

polaires. 4) Les interactions hydrophobes tendent à rapprocher des radicaux apolaires afin de minimiser leur surface de contact avec l'eau.

- Les interactions avec le milieu : en milieu aqueux, les chaînes hydrophobes se rassemblent au centre de la protéine alors que les chaînes polaires s'exposent en surface où elles établissent des liaisons hydrogènes avec l'eau. En milieu lipidique, comme au sein d'une membrane, les chaînes dirigées vers l'extérieur sont hydrophobes, les résidus polaires se rassemblent au centre de la molécule. Cette structure permet la formation de pores traversant la membrane.

Les protéines sont les acteurs cellulaires car elles couvrent de nombreuses fonctions différentes et sont présentes au niveau de tous les compartiments cellulaires. 1) Les protéines catalytiques ou enzymes sont soit membranaires (ex : phosphatase alcaline, 5'-nucléotidase), soit cytoplasmiques (ex : enzymes de la glycolyse, transaminase, créatine kinase). Leur capacité catalytique résulte de leur particularité à former des sites actifs dont la conformation spatiale est spécifique d'un substrat. Elles peuvent posséder des chaînes latérales qui modulent leur vitesse de réaction. 2) Les protéines de structure sont localisées soit dans le sarcoplasme (ex : tubuline, actine, kératine), soit dans le noyau (ex : lamines, histones) ou encore dans les membranes cellulaires. 3) Les protéines de la mobilité possèdent le plus souvent une activité ATPasique leur permettant d'effectuer des couplages chimiomécaniques (ex : dynéine, myosine). 4) Les protéines de transport peuvent être libres dans le sarcoplasme et permettre le transport d'oxygène (ex : myoglobine) ou d'acides gras (ex : fatty acid binding protein) dans la cellule. Impliquées dans les membranes, elles permettent le transport d'électrons (ex : chaîne respiratoire mitochondriale) ou de solutés au travers des membranes (ex : canaux calciques, potassiques). 5) Les protéines de la communication cellulaire sont de deux types, soit ce sont les messagers chimiques comme les hormones ou les neurotransmetteurs, soit ce sont les récepteurs membranaires spécifiques d'un messenger chimique. 6) Les protéines de l'immunité assurent la protection de l'organisme ainsi que son intégrité (ex : anticorps et protéines de la coagulation). 7) Enfin les protéines de la régulation de l'expression des gènes possèdent la propriété de se lier à l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) et ainsi de stimuler ou d'inhiber la transcription des gènes.

Avant de devenir un acteur cellulaire, les protéines sont en premier lieu synthétisées dans le sarcoplasme des cellules à partir de l'information génétique contenue dans l'Acide RiboNucléique messenger (ARNm), c'est la traduction. En second lieu, les « néo-protéines »

subissent différentes transformations permettant leur activation, ce sont les modifications post-traductionnelles. Enfin toutes ces étapes sont régulées selon les besoins de la cellule.

1.3- La traduction

1.3.1- Les éléments nécessaires à la traduction

La traduction est l'étape permettant l'assemblage des acides aminés en une chaîne polypeptidique. Elle permet le décodage de l'information génétique contenue dans l'ARNm en s'appuyant sur le code génétique découvert par Nirenberg entre 1963 et 1966.

	U		C		A		G		
U	UUU	Phénylalanine	UCU	Sérine	UAU	Tyrosine	UGU	Cystéine	U
	UUC	Phénylalanine	UCC	Sérine	UAC	Tyrosine	UGC	Cystéine	C
	UUA	Leucine	UCA	Sérine	UAA	Stop	UGA	Stop	A
	UUG	Leucine	UCG	Sérine	UAG	Stop	UGG	Tryptophane	G
C	CUU	Leucine	CCU	Proline	CAU	Histidine	CGU	Arginine	U
	CUC	Leucine	CCC	Proline	CAC	Histidine	CGC	Arginine	C
	CUA	Leucine	CCA	Proline	CAA	Glutamine	CGA	Arginine	A
	CUG	Leucine	CCG	Proline	CAG	Glutamine	CGG	Arginine	G
A	AUU	Isoleucine	ACU	Thréonine	AAU	Asparagine	AGU	Sérine	U
	AUC	Isoleucine	ACC	Thréonine	AAC	Asparagine	AGC	Sérine	C
	AUA	Isoleucine	ACA	Thréonine	AAA	Lysine	AGA	Arginine	A
	AUG	Méthionine	ACG	Thréonine	AAG	Lysine	AGG	Arginine	G
G	GUU	Valine	GCU	Alanine	GAU	Aspartate	GGU	Glycine	U
	GUC	Valine	GCC	Alanine	GAC	Aspartate	GGC	Glycine	C
	GUA	Valine	GCA	Alanine	GAA	Glutamate	GGA	Glycine	A
	GUG	Valine	GCG	Alanine	GAG	Glutamate	GGG	Glycine	G

Tableau 2 : le code génétique, traduction des codons de l'ARNm en acides aminés.

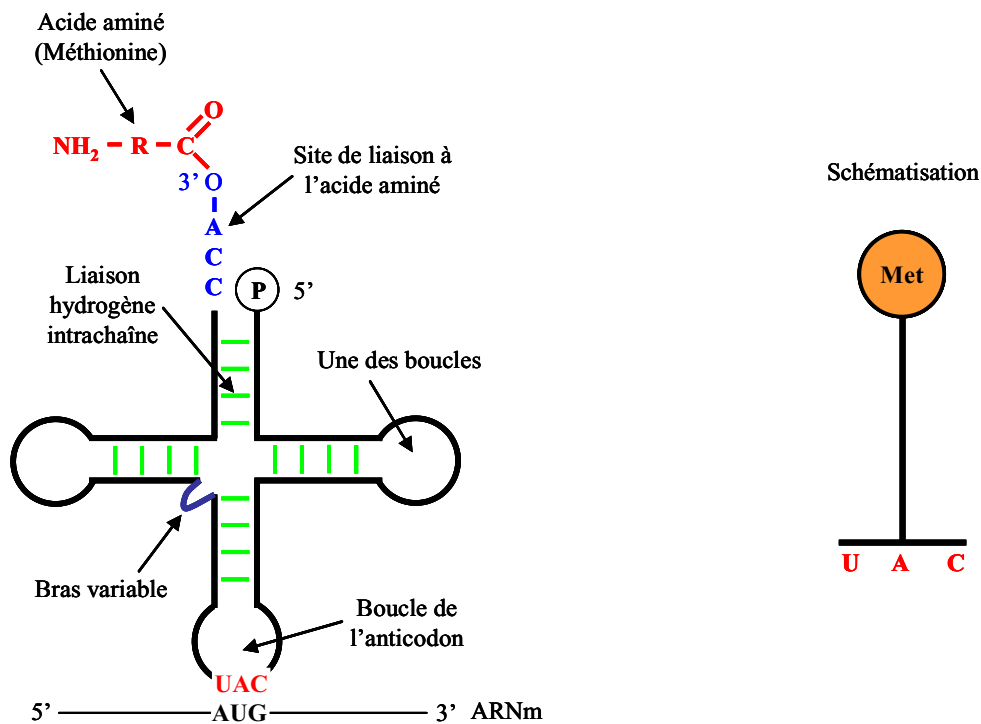


Figure 9: Structure et schématisation de l'ARN de transfert, ici pour la méthionine.

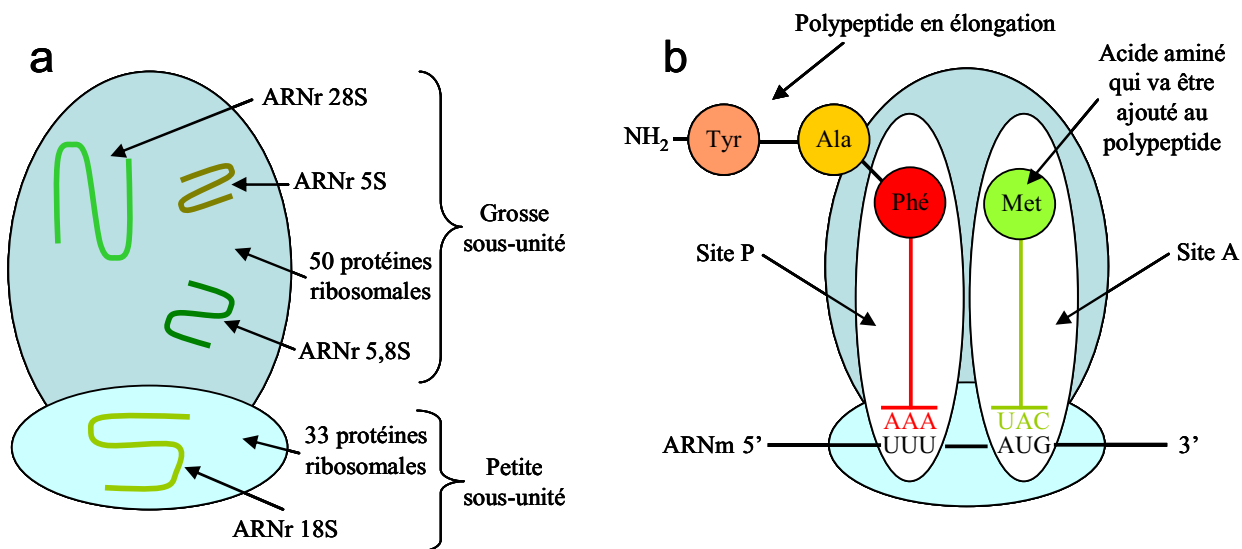


Figure 10: Structure de la petite et de la grosse sous-unité du ribosome.
 a- Constituants du ribosome.
 b- Structure fonctionnelle du ribosome.

La traduction nécessite de l'ARNm, l'ARN de transfert (ARNt), des acides aminés et des ribosomes possédant de l'ARN ribosomal (ARNr).

a- L'ARN de transfert

L'ARNt est constitué d'une séquence nucléotidique de 60 à 90 nucléotides présentant des séquences palindromiques responsables de la forme en feuille de trèfle (Fig. 9). Chaque ARNt possède plusieurs sites fonctionnels :

- L'anticodon est constitué de trois nucléotides dont les bases azotées sont complémentaires et antiparallèles par rapport au codon situé sur l'ARNm.
- Le site de liaison à l'acide aminé est situé à l'extrémité 3' de l'ARNt, sa séquence se finit par CCA. La liaison acide aminé/ARNt est une liaison ester entre la fonction acide de l'acide aminé et le -OH de l'extrémité 3' de l'ARNt.
- Deux boucles latérales et un bras variable interviennent dans la liaison aux ribosomes.

L'ARNt sert d'adaptateur entre l'acide aminé et son codon sur l'ARNm. Chez les eucaryotes, 50 ARNt différents ont été identifiés, codant pour 20 acides aminés, laissant supposer qu'un même acide aminé peut être lié à différents ARNt (tableau 2).

b- Les ribosomes

Les ribosomes (Fig. 10a) sont des molécules de 20 à 30 nm de diamètre constituées d'une petite (40S) et d'une grosse sous-unités (60S) associées ensemble en présence de magnésium et d'ARNm. La petite sous-unité est constituée de 33 protéines et d'une molécule d'ARNr 18S. La grosse sous-unité est constituée de 50 protéines et de trois molécules d'ARNr 28S, 5S et 5,8S.

Le ribosome possède trois sites fonctionnels (Fig. 10b) :

- Le site de liaison à l'ARNm est situé sur la petite sous-unité. La liaison se fait par appariement entre une portion de séquence de l'ARNm et l'ARNr 18S.
- Le site A est à cheval sur les deux sous-unités. Il permet la fixation de l'ARNt entrant.
- Le site P est également à cheval sur les deux sous-unités. Il permet la fixation de l'ARNt lié au polypeptide en cours de synthèse.

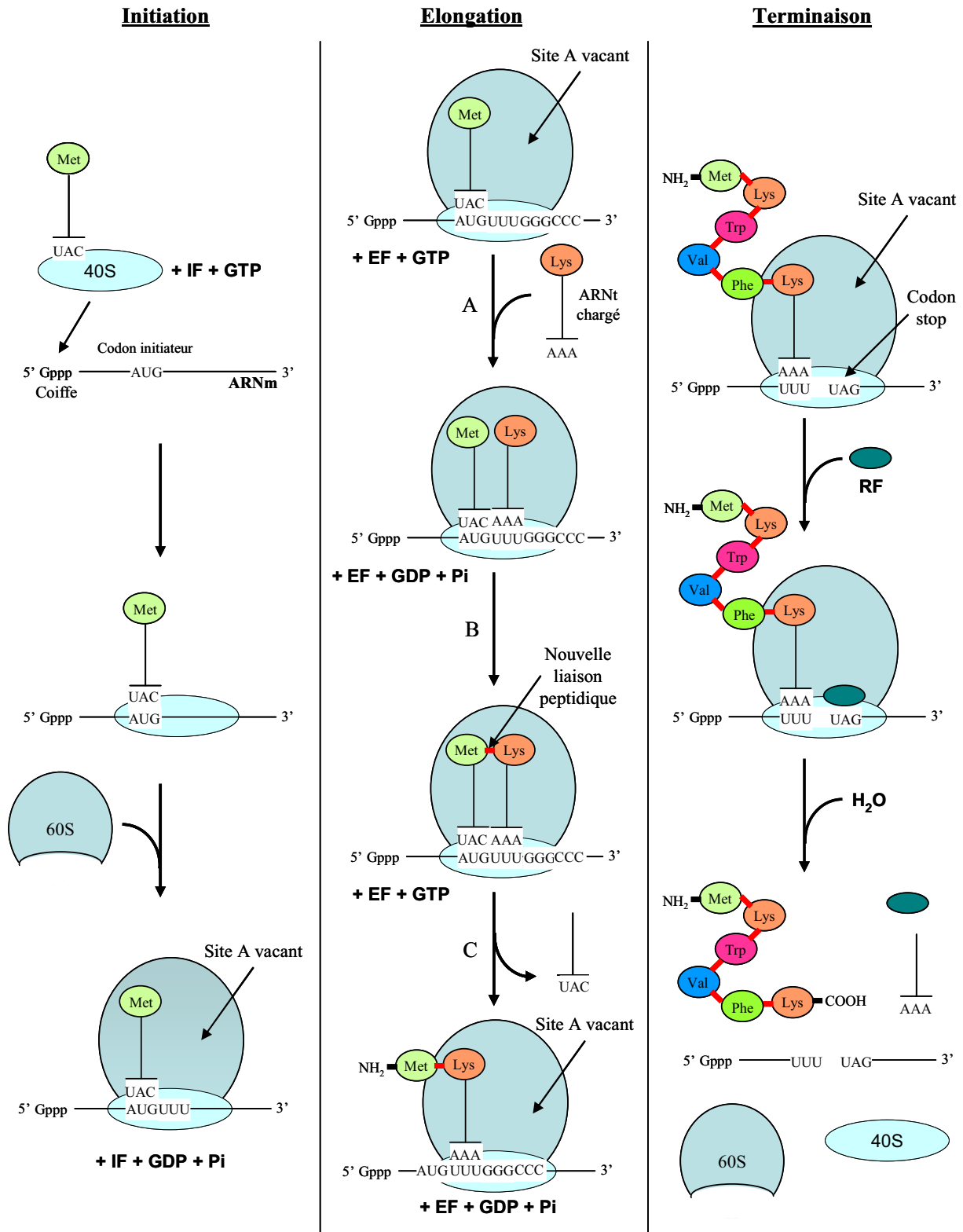


Figure 11: Les étapes de la traduction

Initiation- Fixation du complexe ribosomal sur l'ARN messenger.

Elongation- Synthèse de la chaîne polypeptidique par formation de liaisons peptidiques.

Termination- Libération des différents acteurs et recyclage des sous-unités du ribosome.

La création des liaisons peptidiques s'effectue par l'ARNr 28S de la grosse sous-unité qui possède une activité peptidyl-transférase.

1.3.2- Les étapes de la traduction

Le polypeptide est synthétisé de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale. La traduction se déroule en trois étapes ; l'initiation, l'élongation et la terminaison (Fig. 11).

a- L'initiation

Cette étape permet la fixation des deux sous-unités du ribosome sur l'ARNm. Elle nécessite des facteurs d'initiation et de l'énergie sous forme de GTP et se déroule en deux temps :

- L'ARNt initiateur, chez les eucaryotes, est fixé à la petite sous-unité du ribosome avant l'attachement à l'ARNm. L'ensemble ARNt/petite sous-unité se lie à la coiffe de l'extrémité 5' de l'ARNm puis se déplace jusqu'au codon initiateur AUG.
- La fixation de la grosse sous-unité du ribosome s'accompagne de l'hydrolyse de GTP et fait intervenir les facteurs d'initiation.

A la fin de l'étape d'initiation, le ribosome est positionné au niveau du codon initiateur de l'ARNm, avec son site P occupé par l'ARNt de la méthionine (acide aminé correspondant au codon AUG) et son site A vacant.

b- L'élongation

Cette étape consiste en un ensemble de cycles successifs de trois temps, avec intervention de facteurs d'élongation (eEF pour eukaryotic Elongation Factors), d'ARNt chargés par des acides aminés et d'énergie sous forme de GTP.

- L'ARNt n+1 chargé est activé par la fixation de facteurs d'élongation et de GTP. Puis avec hydrolyse du GTP et libération de facteurs d'élongation, le site A du ribosome, resté vacant à la fin de l'étape d'initiation, est occupé par l'ARNt n+1 chargé reconnu par appariement codon/anticodon.

- La liaison peptidique est formée, entre le groupement carboxyle de l'acide aminé (n) et le groupement amine de l'acide aminé (n+1), par l'activité peptidyltransférase de l'ARNr 28S de la grosse sous-unité du ribosome. C'est une polymérisation de queue ; l'acide aminé (n) est lié à son ARNt par une liaison à fort potentiel hydrolytique, dont l'énergie est utilisée pour la formation de la liaison peptidique.
- Le ribosome se déplace d'un codon sur l'ARNm permettant la translocation de l'ARNt lié au peptide néo-formé du site A vers le site P.

c- La terminaison

L'étape de terminaison fait intervenir des facteurs de relargage. Quand le codon de l'ARNm situé au niveau du site A du ribosome est un des trois codons STOP, il y a fixation d'un facteur de relargage. Celui-ci modifie l'activité peptidyltransférase de l'ARNr 28S qui hydrolyse la liaison entre le dernier acide aminé de la chaîne polypeptidique et l'ARNt du site P. Le peptide est alors libéré, les sous-unités du ribosome se séparent.

Un ARNm est traduit, en même temps, par plusieurs ribosomes qui en fin de traduction sont recyclés et débutent une nouvelle traduction.

1.4- La régulation de la traduction

Le taux de la traduction peut être contrôlé à chacune des trois étapes : initiation, élongation et terminaison. Cependant la régulation a principalement lieu lors de l'initiation, quand le ribosome se fixe sur un ARNm et se positionne sur le codon initiateur.

1.4.1- Importance de la structure de l'ARNm

L'ARNm eucaryote possède des séquences non-codantes aux extrémités 5' et 3' qui influencent l'efficacité de la traduction.

- La coiffe : à l'extrémité 5', l'ARNm possède une structure spécifique, mGpppX (où mG représente une guanosine méthylée ; ppp, un pont triphosphate et X, un des 4 nucléotides ; Shatkin, 1976). Cette structure semble faciliter la traduction de la plupart des ARNm car in vitro, les ARNm ne portant pas de coiffe ont généralement une efficacité de traduction

inférieure à ceux portant une coiffe (Both et al., 1975 ; Muthukrishnan et al., 1975). La coiffe possède également un rôle important dans d'autres processus comme l'épissage des ARN pré-messagers, le transport du noyau jusqu'au cytoplasme et la stabilité des ARNm (Varani, 1997).

- La queue poly(A) : Cette structure, composée de 50 à 200 bases, est située à l'extrémité 3' de l'ARNm. Elle possède un rôle important dans la stabilité des ARNm et l'efficacité de la traduction (Caponigro et Parker, 1996).

1.4.2- Les facteurs d'initiation eIF4

Le terme eIF4 désigne une famille de facteurs d'initiation (eIF4F, eIF4A, eIF4B, eIF4E...) indispensable dans l'étape d'initiation. En particulier, eIF4E, qui participe à la reconnaissance de la coiffe par le ribosome et eIF4G, qui possède des sites de liaisons pour eIF4E, eIF4A, eIF3 et la poly(A)-binding protéine (PABP) et réalise la jonction entre le ribosome et l'ARNm, sont essentiels à la traduction donc à sa régulation. Morley et Traugh (1990) ont mis en évidence l'effet de stimuli extracellulaires ainsi que des voies de signalisation intracellulaire, comme les cascades de protéines kinases sur eIF4E, l'inhibiteur traductionnel 4E-BP1, eIF4B, eIF3 et sur eIF4G.

Le facteur eIF4E est le facteur d'initiation le moins abondant dans la plupart des cellules (Thiemath et al., 1985 ; Duncand et al., 1987). De ce fait, eIF4E est logiquement la cible de la régulation traductionnelle. Le facteur eIF4E est une protéine, impliquée dans un complexe trimérique, qui s'associe à la coiffe de l'ARNm. Trois mécanismes permettent de réguler l'activité de eIF4E : la régulation de l'expression de son gène, sa phosphorylation et la fixation à des protéines inhibitrices.

- La régulation de l'expression du gène de eIF4E n'est pas complètement connue, mais elle semble faire intervenir la protéine MYC (ou facteur de transcription p64) qui en se fixant sur le promoteur du gène de eIF4E stimule son expression (Jones et al., 1996).
- Des études ont démontré que les stimuli extracellulaires tels que les hormones, les facteurs de croissance ou les molécules intervenant dans la croissance cellulaire augmentent le taux de phosphorylation de eIF4E. En effet, durant le cycle cellulaire, le taux de phosphorylation de eIF4E est faible en G₀, augmente durant les phases G₁ et S et est très réduit durant la phase M et est corrélé avec le taux de traduction (Bonneau et Sonenberg,

1987). De même, eIF4E est déphosphorylé après un choc thermique concordant avec une diminution du taux de traduction (Duncan et Hershey, 1989).

- La famille de protéines appelée 4E-BP (4E-Binding protein) interagit avec le facteur eIF4E afin de réguler son activité. En absence de stimuli, les protéines 4E-BP (4E-Binding protein) se fixent au facteur eIF4E, empêchant la formation du complexe impliqué dans l'initiation de la traduction. Sous l'action de stimuli, les protéines 4E-BP sont phosphorylées, elles libèrent le facteur eIF4E permettant l'initiation de la traduction.

1.4.3- Les facteurs d'élongation

La régulation de la traduction durant l'étape d'élongation s'effectue à deux niveaux faisant toujours intervenir les facteurs d'élongation :

- L'ARNm présente fréquemment des séquences palindromiques dans la séquence codante, impliquant la formation de boucle par complémentarité des bases. Ces boucles, protégées par des Iron Response Element Binding Proteins (IREBP), empêchent la translocation correcte du ribosome lors de l'étape d'élongation et bloquent la traduction. Sous l'effet de certains stimuli, le taux intracellulaire du fer augmente, entraînant le détachement des IREBP des boucles d'ARNm. Un facteur d'élongation spécifique, eEF4, peut alors étaler les boucles. Le ribosome peut de nouveau se déplacer librement sur l'ARNm, la traduction reprend normalement.
- La phosphorylation de certains facteurs d'élongation (eEF2 et eEF1) par des protéines kinases permettrait de réguler la synthèse protéique. Le facteur d'élongation eEF2 catalyse la translocation du complexe peptide/ARNt du site A vers le site P du ribosome. La phosphorylation de ce facteur par une protéine kinase calcium dépendante entraîne une diminution du taux de la traduction (Nairn et al., 1985 ; Ryazanov and Spirin, 1990). De même, la phosphorylation de eEF1, qui catalyse la liaison de l'aminoacyl-ARNt au ribosome, modifie la synthèse protéique. Le mécanisme d'action de ces facteurs phosphorylés sur la traduction reste encore inexpliqué.

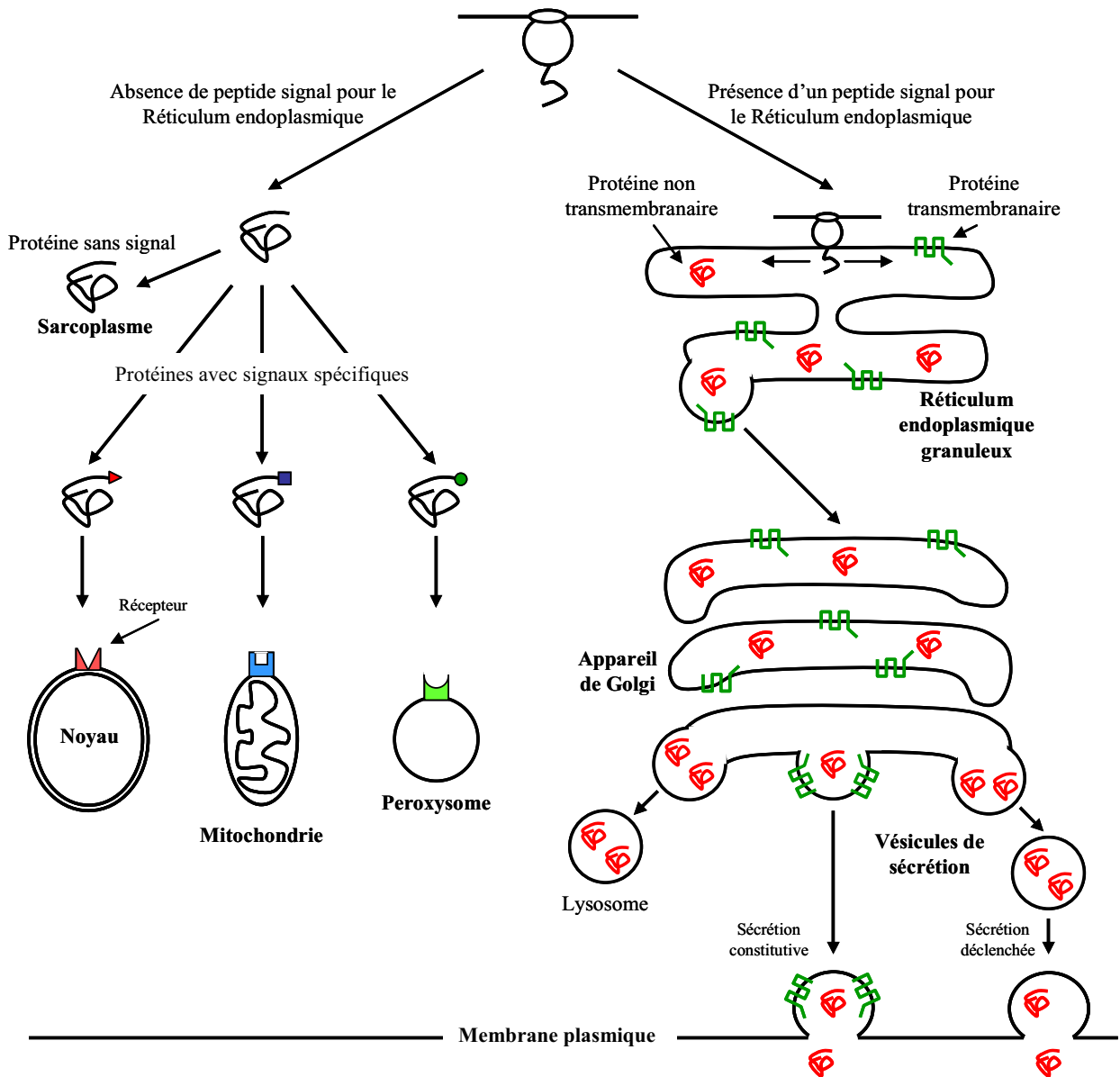


Figure 12: Le système d'adressage des protéines nouvellement synthétisées.

1.5- Le devenir des protéines synthétisées

Une fois synthétisées, les protéines doivent atteindre la structure cellulaire où elles réaliseront leurs fonctions. De plus, la majorité des protéines subissent des transformations leur permettant d'acquérir leurs fonctions définitives. Pour se faire, d'une part, un système d'adressage permet d'aiguiller les protéines nouvellement synthétisées vers leurs sites d'utilisation, d'autre part, elles subissent différentes modifications post-traductionnelles leur permettant d'acquérir leur fonction.

1.5.1- Le système d'adressage

Le site d'utilisation des protéines (Fig. 12) est déterminé par un signal d'adressage qui correspond à une séquence particulière d'acides aminés. Ce signal est donc codé par l'information génétique. Le signal d'adressage est reconnu par des récepteurs qui permettent à la protéine de gagner sa destination finale où le signal est soit excisé soit conservé en permanence comme dans le cas des protéines nucléaires.

Dans le cas des protéines transmembranaires ou destinées à l'excrétion hors de la cellule, le signal d'adressage permet d'orienter la protéine vers le réticulum sarcoplasmique. Par la suite, des signaux polysaccharidiques permettent un nouvel adressage après l'appareil de Golgi vers les lysosomes, les membranes plasmiques ou l'excrétion hors de la cellule.

1.5.2- Les modifications post-traductionnelles

Il existe 5 types de modifications post-traductionnelles :

- L'acquisition de la conformation définitive : elle dépend de la séquence en acides aminés. Elle fait intervenir des protéines chaperones ou chaperonines qui se lient aux polypeptides et facilitent le repliement dans l'espace. Par exemple, la formation des ponts disulfures est parfois catalysée par une enzyme, la disulfide isomérase qui oxyde les groupements thiols de deux cystéines situées sur la même chaîne polypeptidique ou sur deux chaînes différentes.

- L'addition covalente de groupements prosthétiques : elle permet la formation de liaisons covalentes entre la protéine et leur hème dans le cas des cytochromes par exemple.
- La phosphorylation de certains radicaux : elle est catalysée par les phosphokinases avec utilisation d'ATP. Le groupement phosphate ajouté apporte une charge négative à la protéine modifiant sa structure tridimensionnelle donc son activité. La phosphorylation peut être irréversible, comme pour les phosphoprotéines de réserves (caséine, phosphovitrine) ou réversible, la protéine (pompe Na^+/K^+ , lamine) existe alors sous deux états distincts, active ou inactive.
- L'élimination de certains acides aminés : des peptidases excisent soit le peptide signal, s'il existe, soit une séquence d'acides aminés permettant la maturation de la proenzyme en enzyme ou de la prohormone en hormone (ex : La maturation de la proinsuline en insuline).
- La glycosylation : elle se déroule dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi et ne concerne que les protéines transmembranaires, lysosomiales ou de sécrétion. La glycosylation est l'ajout de chaînes latérales glucidiques sur les radicaux de certains acides aminés par des glycosyl-transférases. Chaque chaîne glucidique est spécifique à une protéine permettant le tri et l'acheminement de la protéine mature vers son site d'utilisation.

1.6- Méthodes d'étude du protéome

L'étude du protéome, ou protéomique, consiste à mesurer les quantités de protéines, les identifier et d'appréhender leurs interactions. L'analyse protéomique cherche donc à appréhender l'ensemble des protéines d'un tissu et à réaliser un criblage le plus complet possible des protéines d'intérêt.

Les dosages immunochimiques ciblent spécifiquement une ou deux protéines sur la totalité du protéome. L'électrophorèse monodimensionnelle quant à elle, sépare les protéines selon leur masse moléculaire. Elle ne permet pas de distinguer des protéines dont les masses moléculaires sont équivalentes, mais dont les points isoélectriques (pI) sont différents. L'électrophorèse bidimensionnelle (2D) offre, à l'heure actuelle, la visualisation la plus globale du protéome. Couplée à la spectrométrie de masse pour l'identification protéique, elle permet de déterminer la composition protéique de la cellule à un instant donné. Le contenu protéique de la cellule dépend du patrimoine génétique de l'animal (croisement, mutations,

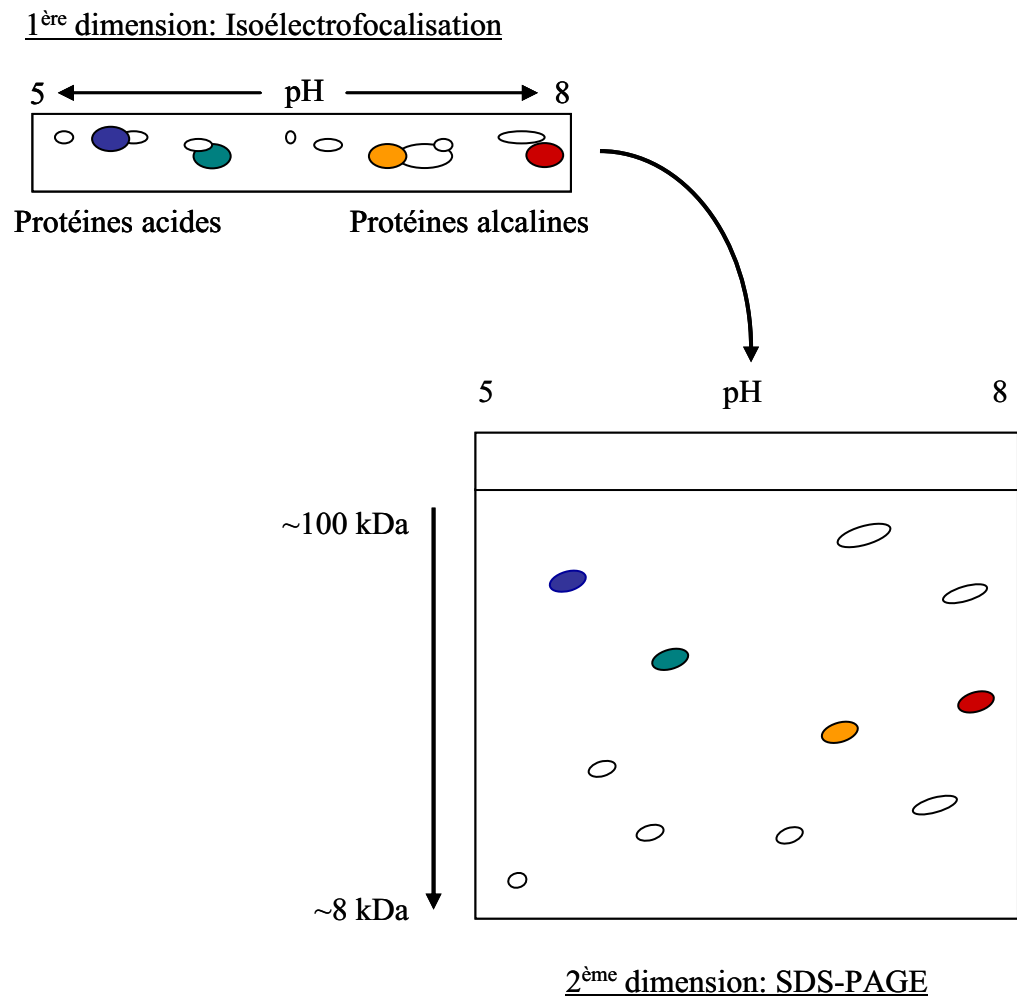


Figure 13: Principe de l'électrophorèse 2D.

- a- Première dimension: séparation en fonction des charges des protéines.
- b- Deuxième dimension: séparation en fonction de la masse moléculaire.

sexe et gènes majeurs) et de facteurs modulateurs à long terme, c'est-à-dire tout au long de la vie de l'animal (conditions de vie) ou à plus court terme, comme par exemple lors des étapes de pré-abattage.

1.6.1- L'électrophorèse bidimensionnelle

a- Principe

L'électrophorèse bidimensionnelle (Fig. 13) permet à partir d'un mélange protéique complexe de séparer et visualiser une partie des protéines présentes dans la cellule au moment de l'échantillonnage. La résolution est suffisante pour mettre en évidence les différentes isoformes d'une protéine. L'électrophorèse bidimensionnelle se décompose en deux étapes qui correspondent aux deux dimensions : l'isoélectrofocalisation et l'électrophorèse en gel d'acrylamide.

- La première dimension ou isoélectrofocalisation (IEF) (Fig. 13a) : les protéines sont des molécules amphotères, elles peuvent se comporter comme un acide ou comme une base selon le pH de la solution. Pour une protéine donnée, sa charge électrique varie selon le pH et s'annulent pour une valeur de pH égale à son pI. Ainsi, la protéine est chargée positivement pour un pH inférieur à son pI et négativement pour un pH supérieur. Cette propriété des protéines constitue le principe de la première dimension. En effet, sous l'effet d'un courant électrique, les molécules migrent dans un gradient de pH jusqu'à atteindre leur pI. A cette valeur de pH, les protéines possèdent une charge électrique nulle, n'étant plus influencées par le courant électrique, elles s'immobilisent.
- La deuxième dimension (Fig.13b) : lors de la première dimension, les protéines ont perdu leurs charges électriques. Afin de les rendre sensibles au courant électrique permettant la séparation des protéines selon leurs poids moléculaires, elles subissent un traitement au Sodium Dodécyl Sulfate (SDS). Cet agent anionique se fixe sur les protéines et forme un complexe de charge négative. Il déplie également les protéines en rompant les interactions de la structure tridimensionnelle. Les protéines sont ensuite stabilisées par réduction et alkylation. Ainsi la migration dans le gel de deuxième dimension est déterminée uniquement par le poids moléculaire des protéines et sans interférence due à la forme de la structure tridimensionnelle.

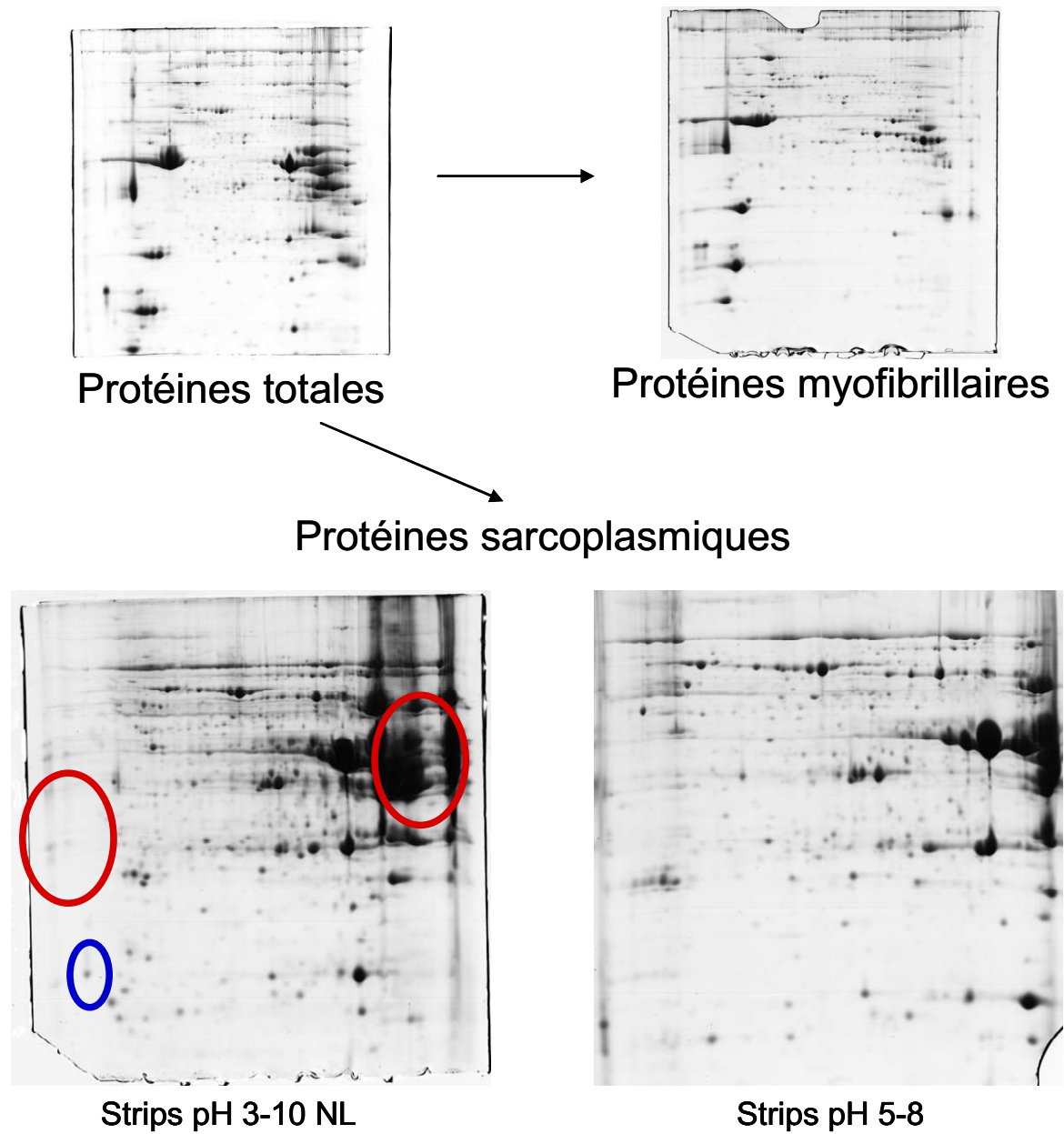


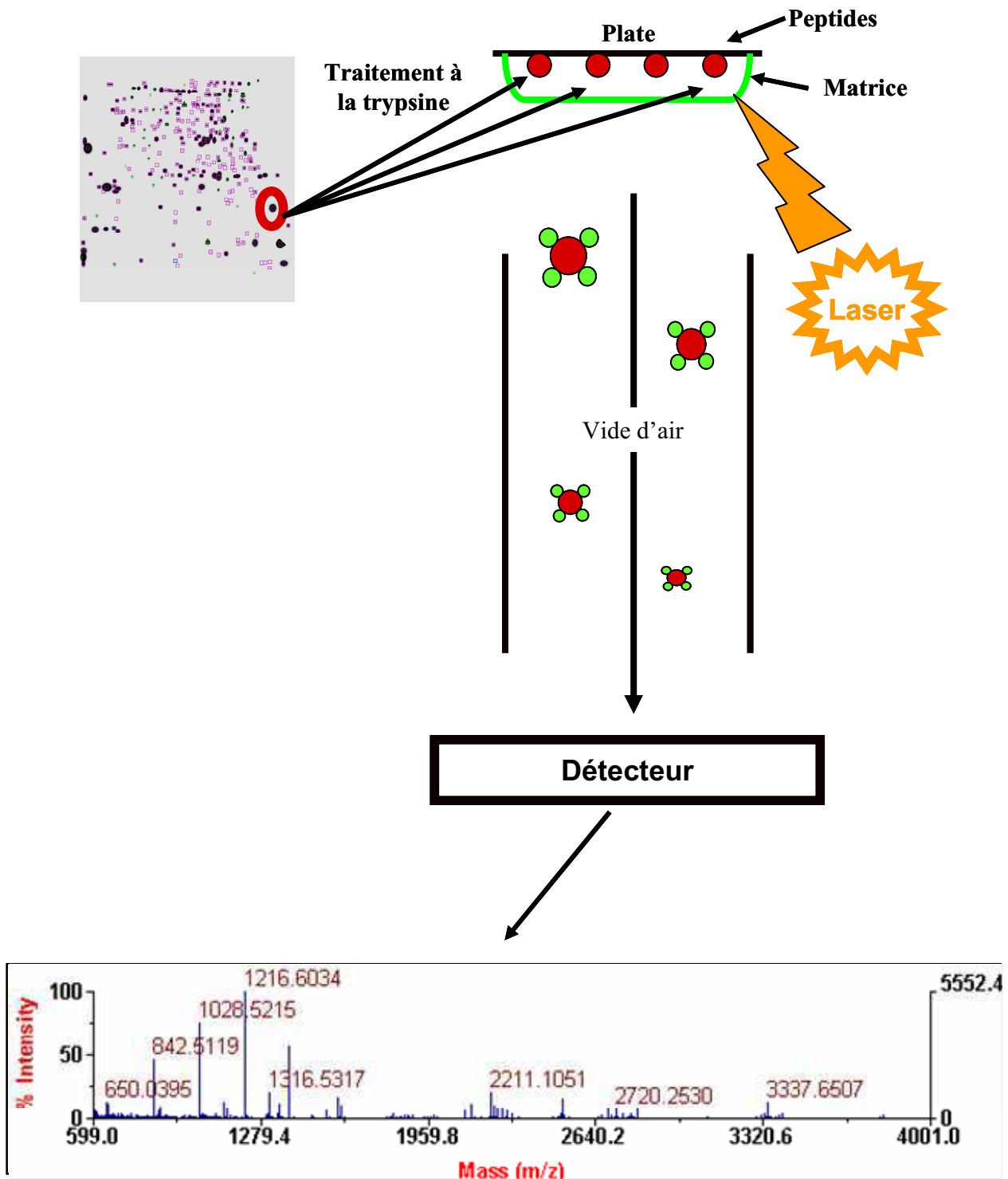
Figure 14: L'extraction fractionnée permet l'enrichissement des différentes fractions en protéines peu représentées.

La visualisation des spots sur les gels est par la suite réalisée lors d'une étape de coloration au bleu de Coomassie (bleu colloïdal G250). Cette technique permet de déposer de 400 à 1000 µg de protéines par gel. Elle est donc moins résolutive que le nitrate d'argent (seuil de détection de 10 ng au minimum), mais les réactifs utilisés n'interfèrent pas avec ceux utilisés lors de l'étape d'identification des protéines par spectrométrie de masse. De plus, à la différence du nitrate d'argent, l'intensité des spots est proportionnelle à la quantité de protéines.

Une étude en électrophorèse 2D basée sur des extraits de protéines totaux ne permettrait pas de mettre en évidence les variations des protéines faiblement représentées car elles sont cachées par celles fortement représentées. Les méthodes de fractionnement cellulaire sont des techniques simples pour enrichir les extraits en protéines faiblement représentées (Huber et al., 2003 ; Stasyk et Huber, 2004).

b- L'extraction fractionnée

Les cellules musculaires contiennent 50% de protéines myofibrillaires (myosine, actine, etc.), 20% de protéines stromales (collagène, fibrine, etc.) et 30% de protéines dites sarcoplasmiques, c'est-à-dire, des protéines solubles dans le cytoplasme des cellules musculaires, comme les enzymes, certaines protéines de transport, les chaperonnes, etc. Afin de formuler des hypothèses sur la façon dont les protéines interagissent et de proposer des mécanismes explicatifs sur l'origine d'un défaut ou d'une particularité qualitative de la viande, nous nous sommes attachés à étudier la fraction sarcoplasmique du protéome parce qu'elle contient les principaux médiateurs des réactions biochimiques de la cellule musculaire. Le protocole d'extraction utilisé, décrit par Sayd et al. (2006), permet de séparer les protéines solubles des protéines insolubles dans un tampon à faible force ionique (Pietrzak et al., 1997). Les protéines insolubles sont majoritairement constituées par des protéines myofibrillaires et stromales. La figure 14 compare des gels réalisés à partir d'extrait de protéines totales, de protéines myofibrillaires et sarcoplasmiques pour une quantité de protéines déposée identique. Les gels issus de l'extraction fractionnée présentent un appauvrissement en protéines des fractions myofibrillaires et stromales permettant l'étude des protéines faiblement représentées, comme les protéines sarcoplasmiques.



Empreinte peptidique massique

Figure 15: Principe du spectromètre de masse MALDI-ToF.

c- Les limites de l'électrophorèse bidimensionnelle

L'électrophorèse 2D possède néanmoins des limites dues aux caractéristiques de chaque dimension. Le pouvoir de résolution de la première dimension est favorisé par des gradients de pH étroits. Afin d'appréhender le protéome en totalité, il faut travailler sur des gradients de pH complémentaires, permettant la meilleure résolution pour chaque gamme de pH. Dans notre étude, le choix de protéines sarcoplasmiques nous a conduit à l'utilisation d'un gradient de pH se situant entre pH 5 et pH 8. En effet, à pH inférieur à 5, très peu de protéines sarcoplasmiques sont représentées et à pH supérieurs à 8, l'analyse est rendue difficile par l'abondance de chacune des protéines (phénomènes de saturation empêchant la quantification des spots). De plus, les relations entre la majorité de ces protéines et les qualités des viandes sont bien décrites dans la littérature.

La concentration (11%) en acrylamide et bisacrylamide du gel de deuxième dimension utilisée ne permet pas d'observer les protéines de poids moléculaire inférieur à 10kDa et supérieur à 90kDa. En effet, les premières migrent trop rapidement et sortent du gel avant le front de migration, les secondes sont trop volumineuses pour pénétrer correctement dans le gel et restent mal résolues. Enfin, l'électrophorèse 2D ne permet pas d'observer les protéines très faiblement représentées dans la cellule ainsi que toutes les protéines non solubles.

1.6.2- La spectrométrie de masse : MALDI-ToF

A la suite de l'analyse des gels de deux dimensions, les spots d'intérêt sont identifiés. Cette identification apporte des informations importantes sur la localisation cellulaire et la fonction de ces protéines.

a- Principe

La protéine à identifier subit tout d'abord un traitement à la trypsine (Fig. 15). Cette endoprotéase hydrolyse les liaisons peptidiques en C-terminal des acides aminés basiques (Lysine (Lys), Arginine (Arg)). Les différents peptides obtenus sont par la suite cristallisés sur une surface métallique sous l'action d'une matrice (le plus souvent de l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique). Sous l'effet d'un laser pulsé dans l'UV, la matrice est ionisée entraînant avec elle les peptides. Les peptides ionisés parcourent ensuite un tube sous vide jusqu'à un

détecteur qui détermine le temps de vol entre la plaque et le détecteur. Ce temps de vol étant proportionnel au rapport masse/charge (m/z), une empreinte massique de l'ensemble des peptides ionisés, spécifique de la protéine inconnue, est créée. Il faut alors comparer cette empreinte peptidique massique aux empreintes théoriques des protéines identifiées, regroupées dans différentes bases de données. Deux programmes informatiques, Mascot (<http://www.matrixscience.com>) et Profound (<http://prowl.rockefeller.edu>) permettent d'assister la recherche.

b- Limites de la spectrométrie de masse

Jusqu'à la fin des années 70, seules les molécules de faible poids moléculaire pouvaient être identifiées. Au début des années 80, deux techniques d'ionisation permettent l'étude de grandes molécules en induisant très peu de fragmentation : l'ionisation par électrospray (ESI) et la désorption-ionisation laser assistée par matrice (en anglais *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation* ou MALDI). La masse des molécules sera ensuite déterminée par les analyseurs de masse : les filtres quadripolaires, les trappes ioniques et les appareils à temps de vol.

Le MALDI est la méthode d'ionisation des peptides et des protéines en association avec un appareil à temps de vol (en anglais : Time of Flight ou ToF). L'échantillon est cristallisé dans la matrice puis ionisé sous l'effet d'un laser. Les ions libérés par paquets sont par la suite analysés en déterminant le rapport masse / charges. Ce type de spectromètre permet l'identification de protéines à partir de leur empreinte peptidique, ce qui implique que les protéines recherchées appartiennent à un génome séquencé ou partiellement séquencé. Le MALDI-ToF est une technique sensible (pouvant détecter un peptide de quelques femtomoles de concentration), précise, simple et rapide. Lors des analyses, les sels inorganiques, contenus dans les extraits protéiques, interfèrent avec le processus de cristallisation et d'ionisation. Les sels sont enlevés, lors de la préparation des échantillons, par passage sur une colonne de purification. Le diamètre du spot de la cible étant plus large que celui du laser, il est nécessaire de procéder à plusieurs tirs lasers en différents endroits de la cible, afin d'obtenir la moyenne de l'ensemble des spectres obtenus. La composition de la matrice, l'ajout d'acide trifluoroacétique, le délai entre les impulsions, le temps d'attente pour la puissance d'accélération, la longueur d'onde du laser, l'intensité et l'angle d'impact du faisceau laser figurent parmi les autres données critiques pour la qualité et la reproductibilité de la méthode.

1.6.3- Apports de la protéomique à l'étude des qualités de viande.

Dans cette partie, nous allons nous efforcer de démontrer en quoi l'étude globale du protéome permet de proposer des mécanismes explicatifs sur l'origine de défauts ou d'une particularité qualitative de la viande.

Chez le porc, une mutation sur le gène du canal calcique à la ryanodine (allèle n ; cf paragraphe 4.3.1, p33) est à l'origine de graves bouleversements métaboliques conduisant à des défauts qualitatifs importants de la viande. Entre les porcs porteurs de la mutation et les porcs non porteurs, les différences d'expression protéique peuvent se résumer à une simple opposition dans l'expression des protéines impliquées dans les métabolismes énergétiques (oxydatif vs. glycolytique). Les protéines surexprimées chez les porcs porteurs de la mutation relèvent du métabolisme glycolytique (Sayd et al., 2006).

La dénaturation des protéines est l'un des phénomènes physico-chimiques intervenant dans le muscle *post-mortem*. Elle est provoquée par l'acidification du muscle, la dessiccation, l'exposition à des concentrations en sels élevées ou à des températures très basses (<0°C) ou élevées (Lawrie, 1998). Plusieurs mesures peuvent rendre compte de la dénaturation, les plus utilisées étant la solubilité (mesures de concentrations protéiques de la fraction du muscle solubilisée dans un tampon phosphate) ou la mesure du degré d'hydrophobicité. La combinaison d'un pH bas et d'une température élevée accroît le degré de dénaturation des protéines, comme c'est le cas par exemple dans la viande dite PSE chez le porc ou la volaille (Sosnicki et al., 1998). Un second phénomène physico-chimique *post-mortem* est la protéolyse qui survient après la sortie de la *rigor mortis* et résulte principalement de l'action des enzymes protéolytiques sur les protéines de structure. Ainsi, la dégradation de certaines protéines myofibrillaires et cytosquelettiques, telles que la titine (Fritz et Greaser, 1991), la nébuline (Taylor et al, 1995; Huff-Lonergan et al, 1995), la desmine (Koochmaraie et al, 1991; Takahashi, 1996) et la troponine T (Ho et al, 1994) au cours de la maturation de la viande est largement acceptée. Les systèmes protéolytiques impliqués dans la maturation de la viande et dans la perte de fraîcheur du poisson sont les mêmes que ceux qui assurent la dégradation des protéines au cours des cycles de renouvellement cellulaire chez l'animal vivant (Ashgar et Bhatti, 1987). Trois systèmes enzymatiques majeurs sont susceptibles d'intervenir : les calpaïnes, les cathepsines et le protéasome. On évoque aussi depuis peu l'intervention des

systèmes enzymatiques impliqués dans l'apoptose, les caspases (Sentandreu et al., 2002 ; Herrera-Mendez et al., 2006).

L'utilisation de l'outil protéomique a apporté de nouvelles informations sur les phénomènes protéolytiques. Dans la plupart des études entreprises, la présence de fragments a été observée dès les premiers prélèvements post mortem, laissant supposer que ces fragments existent dans le muscle de l'animal vivant (Morzel et al., 2004, Sayd et al., 2006). La surabondance de fragments de créatines kinases et d'énolases dans des muscles de porc prélevés très tôt après la mort et générant une viande foncée a conduit à formuler une hypothèse selon laquelle cette protéolyse exacerbée était liée au métabolisme plus oxydatif par ailleurs traduit par la plus grande quantité d'enzymes mitochondriales de la chaîne respiratoire (Sayd et al., 2006). La conséquence sur la qualité de viande n'est pas ici directe, mais le degré de protéolyse nous indique que nous sommes dans des conditions métaboliques particulières. Cette étude a également permis d'identifier des cibles (protéiques et structurales) de la protéolyse post mortem jusqu'alors non connues, appartenant au compartiment sarcoplasmique (α -crystalline, myokinase). Il s'agit aussi de protéines de la strie Z (protéines cypher et myozénine), ce qui contribue très probablement à l'affaiblissement de la strie Z pendant la maturation de la viande (Morzel et al., 2004).

Les phénomènes protéolytiques induisent un défaut de déstructuration du jambon qui se manifeste d'abord par une décoloration des muscles situés à l'intérieur du jambon frais. Après la cuisson, cette zone se désagrège lors du tranchage et occasionne des pertes économiques considérables. Les protéomes de deux lots de jambons (clairs et foncés, considérés représenter des jambons exprimant et n'exprimant pas le défaut respectivement) ont été comparés. Cette étude a montré que les muscles foncés ont un métabolisme plus oxydatif associé à davantage de protéines chaperones. Cette composition protéique atténuerait la vitesse de chute du pH et la dénaturation des protéines. Les muscles clairs associent un métabolisme glycolytique prononcé à une surexpression d'un transporteur de fer (transferrine). Cette protéine, révélatrice d'une hypoxie, montrerait une déficience en oxygénation du muscle (moindre vascularisation, incapacité de l'animal à adapter son flux sanguin au stress de l'abattage). Dans les muscles clairs, la surexpression de la glutathion S-transférase omega (GSTO) pourrait contribuer à une constante augmentation du calcium sarcoplasmique et donc à la production de composés oxydants. Associée au métabolisme glycolytique, cette protéine peut accélérer la déplétion d'ATP, la vitesse de chute du pH et par conséquent la dénaturation des protéines, ce qui a pour conséquence une décoloration de la viande et une déstructuration après la cuisson (Sayd et al., 2006).

Dans une autre étude, Laville et al. (2005) ont caractérisé des muscles semimembranosus de porc touchés par un défaut de déstructuration, c'est à dire la présence de zones PSE dans les régions profondes du muscle. La dénaturation de protéines sarcoplasmiques et myofibrillaire ainsi que l'altération de profils électrophorétiques mono-dimensionnels, similaires à ceux décrits précédemment (Joo et al., 1999) dans la viande PSE, ont été observées. L'originalité de l'étude, toutefois, résidait dans l'utilisation de l'électrophorèse 2D pour la caractérisation du défaut. Laville et al. ont observé la sous-représentation d'une forme d'HSP27 dans la viande déstructurée. Etant donné le rôle de cette protéine dans la stabilisation des myofilaments d'actine, il est possible qu'une moindre quantité de cette protéine favorise la dénaturation des protéines constitutives des filaments fins.

Le stress d'abattage, avec ses composantes émotionnelles et physiques, induit de nombreuses perturbations de la physiologie musculaire, qui peuvent se répercuter sur la qualité de la viande. Ceci a été largement documenté dans la plupart des espèces de rente, et plus encore chez le porc, la volaille et les poissons d'élevage. Chez le porc et la volaille, une des conséquences d'une activité musculaire exacerbée immédiatement avant la mise à mort est la baisse du pouvoir de rétention en eau. Ce phénomène passe notamment par l'augmentation de la température des muscles et l'accélération de la glycolyse post mortem, conduisant, *post-mortem*, à un pH bas et une température élevée favorisant la dénaturation des protéines (Bendall et Wismer-Pedersen, 1962) et notamment celle de la myosine et des protéines sarcoplasmiques (Sosnicki et al., 1998). Ceci a été reporté comme étant la cause majeure d'exsudation excessive (Offer, 1991). Un autre exemple de conséquences néfastes du stress d'abattage est l'amollissement de la chair chez plusieurs espèces de poissons (Sigholt et al., 1997; Morzel et al., 2003). Afin d'étudier les mécanismes sous-jacents, une étude comparative du protéome musculaire de deux lots de truites arc-en-ciel a été menée. Un lot était abattu dans des conditions limitant l'activité musculaire (pêche immédiatement suivie d'une anesthésie chimique et saignée pendant cette phase de conscience altérée), le deuxième lot étant soumis à un abaissement du niveau d'eau dans le bassin pendant quinze minutes, ce qui entraîne une forte agitation du groupe, avant d'engager la même procédure de pêche, anesthésie puis saignée. L'activité musculaire intense de 15 minutes suffit à modifier la proportion relative de plusieurs enzymes du métabolisme énergétique mais aussi de protéines de structure, très tôt (45 minutes) après la mort. Après 24h, les différences entre les deux groupes de truites sont très atténuées mais la desmine, une des protéines de structure, demeure sous-représentée chez les truites soumises à activité musculaire. Cette protéine a été proposée à plusieurs reprises comme un marqueur de fraîcheur chez le poisson. Ainsi, l'activité

physique engendrée par un serrage prolongé des poissons influencerait la texture et la fraîcheur de la chair en affectant le cytosquelette de la cellule musculaire (Morzel et al., 2006).

Le différentiel d'expression protéique n'indique pas nécessairement la cause de l'apparition d'une particularité qualitative des viandes. Mais elle ouvre des pistes pour expliquer les mécanismes sous jacents aux propriétés des muscles et des viandes. Mon étude se propose de mettre en relation entre elles les quantités de certaines protéines sarcoplasmiques, reflétant des évènements *post-mortem* biochimiques impliqués dans le déterminisme des qualités de la viande de porc. Les paramètres de qualités de viande étant influencés par de nombreux facteurs comme l'origine génétique ou les conditions d'élevage, mon étude s'attache à prendre en compte ces paramètres et d'étudier leur influence sur les mécanismes de déterminismes des qualités des viandes. L'étude protéomique peut également être utilisée pour la détermination de marqueurs d'un caractère phénotypique que l'on souhaite retenir ou éliminer par la sélection ou les conditions d'élevage ou d'abattage. Mon étude propose de déterminer les relations entre l'origine génétique ou environnementale des animaux et les quantités de protéines du métabolisme cellulaire. Cette approche pouvant être utilisée pour la détermination de marqueurs de l'origine de l'animal (mode d'élevage, type génétique) comme alternative aux marqueurs génétiques utilisés dans les techniques de traçabilité.

Le phénotype, auquel appartiennent les paramètres de qualités des viandes, est la représentation de l'expression de l'information génétique contenue dans l'ADN. Cependant, les différentes étapes intermédiaires, transcription et traduction, sont régulées en fonction des besoins de la cellule et de l'organisme. L'analyse protéomique permet de démontrer l'influence des facteurs de variation sur les qualités des viandes en étudiant les variations dans les mécanismes biochimiques du métabolisme cellulaire. Afin d'étudier l'influence des facteurs de variation sur les modifications dans l'expression des gènes, et leurs conséquences sur les qualités de viandes, une analyse transcriptomique a également été réalisée.

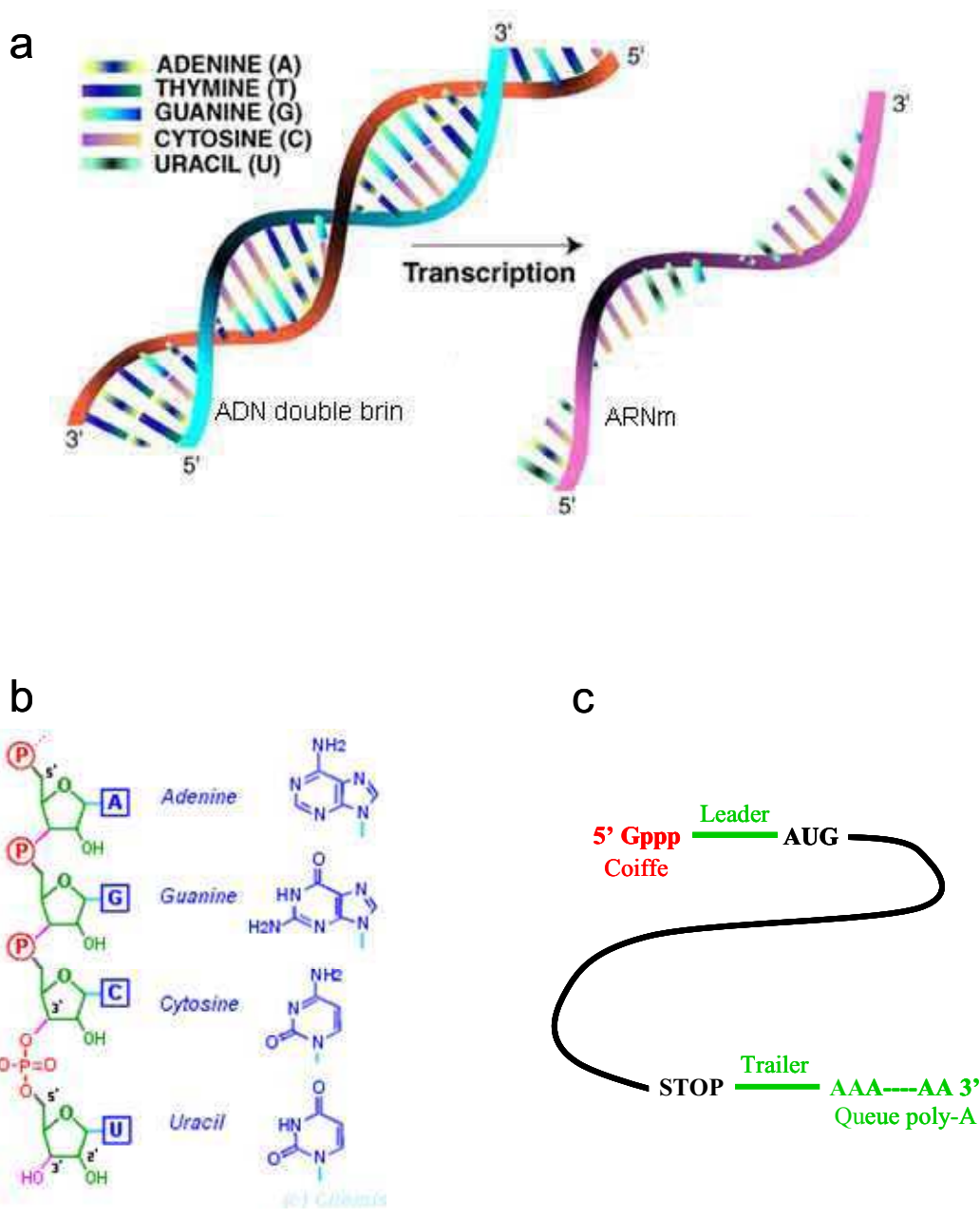


Figure 16: Structure de l'ARN.

- a- Comparaison de la structure de l'ADN bicaténaire et de l'ARN monocaténaire.
- b- Structure moléculaire de l'ARN. La thymine est remplacée par un autre nucléotide, l'uracile.
- c- Séquences fonctionnelles de l'ARN messager.

2- Le transcriptome

2.1- Définition

Le génome, c'est-à-dire l'ensemble des gènes constituant l'information génétique portée par l'ADN, est identique dans chacune des cellules d'un organisme donné. En revanche, l'expression génique diffère en fonction du temps, de l'organe et caractérise un état physiologique donné. Le transcriptome est l'ensemble des ARN messagers (ARNm) issu de l'expression génique d'un type cellulaire donné, à un instant donné. Son étude consiste à caractériser et à quantifier les ARNm de manière à identifier les séquences de l'ADN actives, de déterminer les mécanismes de régulation d'expression des gènes et de définir les réseaux d'expression des gènes.

2.2- La structure des ARN

En 1961, Jacques Monod et François Jacob mettent en évidence l'existence d'une molécule intermédiaire entre l'ADN et les protéines. Ils inventent ainsi le concept d'ARNm récompensé par le prix Nobel de médecine en 1965.

L'ARN ou acide ribonucléique est une chaîne monocaténaire (Fig. 16a) constituée d'une succession de nucléosides, adénosine, guanosine, cytidine et un quatrième, spécifique de l'ARN, l'uridine (Fig. 16b). La thymidine, qui existe dans l'ADN, n'existe pas dans l'ARN. Chaque nucléoside est constitué d'une base azotée, adénine, guanine, cytosine ou uracile, d'un pentose lié à la base azotée au niveau de son carbone 1, le ribose, et d'un groupement triphosphate, lié au carbone 5 du ribose. Les nucléotides sont assemblés entre eux par un pont phosphate entre le carbone 5 et le carbone 3 du ribose. Comme pour l'ADN, les 4 nucléotides peuvent s'associer par complémentarité ; uracile/adénine et guanosine/cytosine. Le brin d'ARN possède également une orientation déterminée par les fonctions libres des nucléotides. L'extrémité 5' est caractérisée par une liaison entre un triphosphate et le carbone 5 du ribose alors que l'extrémité 3' est caractérisée par la fonction -OH libre au niveau du carbone 3 du sucre.

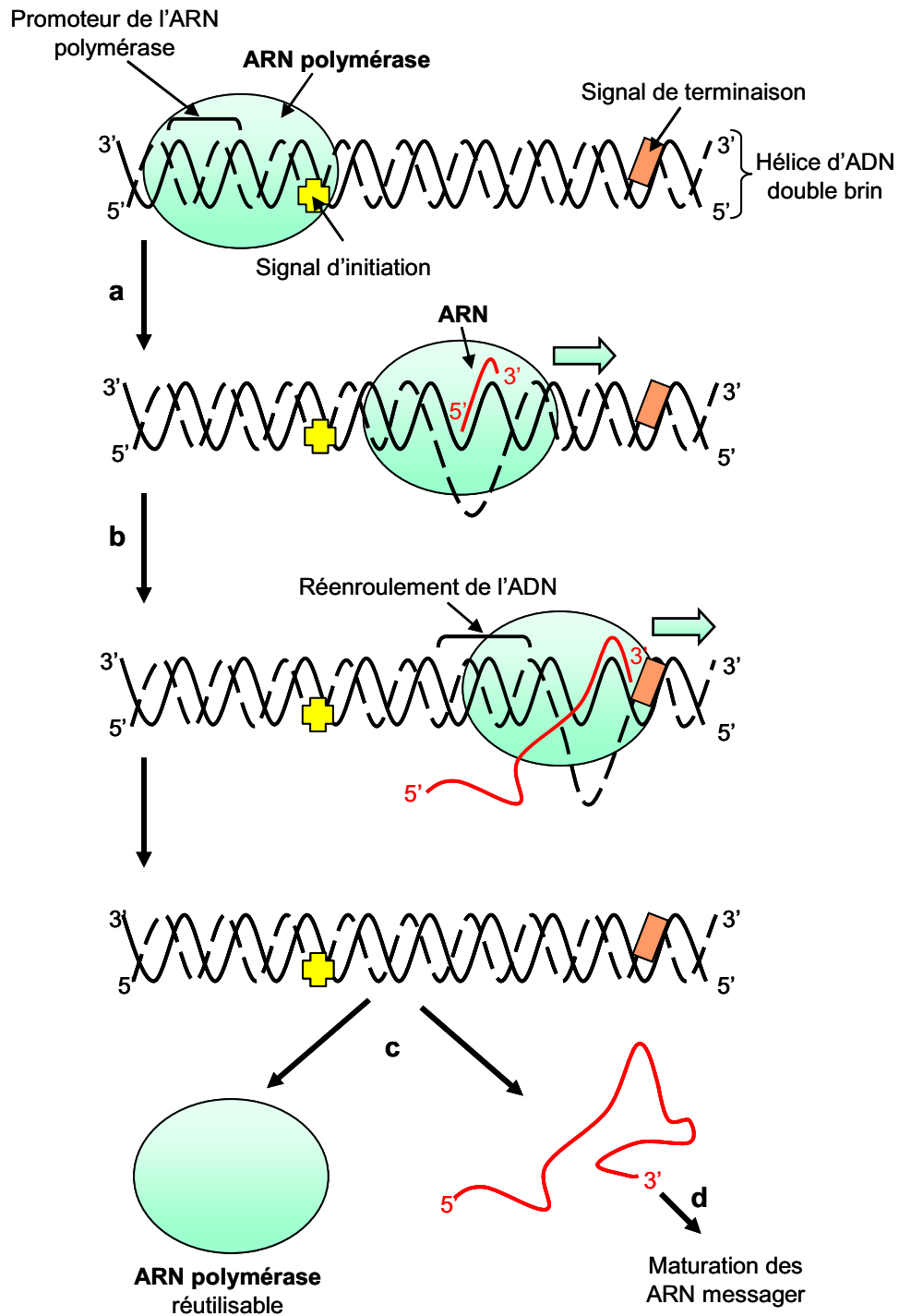


Figure 17: Les étapes de la transcription

- a- Ouverture de la double hélice d'ADN et initiation de la chaîne d'ARN au niveau du signal d'initiation de la transcription.
- b- Elongation de la chaîne d'ARN dans la direction 5' - 3' par appariement des bases complémentaires. L'ADN se referme.
- c- Terminaison et libération de l'ARN polymérase et de la chaîne d'ARN achevée.
- d- Maturation des ARN messager par épissage alternatif des introns.

Il existe trois types d'ARN différents :

- Les ARN messagers sont des copies du brin d'ADN. Ils transportent l'information génétique du noyau au cytoplasme des cellules, site de la synthèse des protéines.
- Les ARN de transferts (ARNt) font le lien entre le code génétique et les acides aminés.
- Les ARN ribosomiaux (ARNr) entrent dans la composition des ribosomes et possèdent une fonction dans la traduction.

L'analyse du transcriptome ne concernant que les ARNm, ils seront les seuls à faire l'objet d'un développement dans la suite du document.

L'ARNm porte la séquence codant pour les protéines. Afin de réaliser cette fonction, il possède trois types de séquences différentes (Fig. 16c) :

- Les séquences non codantes, leader à l'extrémité 5', situé après la coiffe et trailer à l'extrémité 3', situé avant la queue poly-A, ne donnent jamais de polypeptides.
- Les séquences codantes, situées entre le codon initiateur AUG et l'un des trois codons STOP (UAA, UGA ou UAG), est le modèle pour la séquence protéique. Elle est dite monocistronique car à la différence des procaryotes, elle ne code que pour un seul polypeptide.
- Le site d'attachement à la petite sous-unité du ribosome, ou coiffe, est nécessaire à l'initiation de la traduction.

2.3- La transcription

Chez les eucaryotes, il existe trois enzymes responsables de la synthèse des ARN mais seule l'ARN polymérase II intervient dans la synthèse des ARN messagers. Les ARN polymérases sont des protéines complexes constituées de 10 sous-unités. Afin de reconnaître les promoteurs et donc leurs sites de fixation à l'ADN, les ARN polymérases ont besoin de l'intervention de facteurs de transcription.

2.3.1- La synthèse d'un transcrit primaire

A la différence des procaryotes, chez les eucaryotes, la transcription est séparée de la traduction par la membrane nucléaire, permettant une régulation plus fine mais plus lente de l'expression des gènes. La transcription (Fig. 17), à proprement parler, fournit des transcrits

primaires ou ARN pré-messagers (ARNpm) formés d'exons, parties codantes, et d'introns, parties non codantes éliminées lors des modifications post-transcriptionnelles.

La transcription se déroule en 3 étapes ; l'initiation, l'élongation et la terminaison.

a- L'initiation

En amont du site d'initiation de la transcription, deux séquences consensus (conservées chez l'ensemble des « êtres vivants ») constituent les promoteurs de la transcription. L'une est située de -110 à -140 paires de bases (pb) en amont du site d'initiation de la transcription (Fig. 17a). L'autre, nommée boîte TATA, est située de -25 à -30 pb en amont du site d'initiation et permet la fixation du complexe ARN polymérase II/facteurs de transcription (ARNpol/FT) sur la séquence ADN.

b- L'élongation

L'étape d'élongation (Fig. 17b) est catalysée par l'ARN polymérase II. Elle s'effectue par complémentarité des bases azotées par rapport au brin d'ADN matrice. Le brin d'ARN est synthétisé de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'. La transcription est également réalisée au niveau des histones (protéines de structure impliquées dans la compaction de l'ADN) par désorganisation partielle de ceux-ci. Afin de protéger les ARNm de l'action des nucléases et permettre la fixation de la petite sous-unité du ribosome lors de la traduction, une coiffe, constituée d'une guanosine méthylée, est mise en place à l'extrémité 5' de l'ARN grâce à un pont triphosphate.

c- La terminaison

Chaque unité de transcription présente en fin de séquence un signal de terminaison (Fig. 17c) qui de nos jours est encore mal connu. Toutefois, sa transcription constitue un signal pour le clivage de l'ARNpm. Après libération de l'ARNpm, la poly-A-polymérase, une enzyme ADN indépendante, intervient en ajoutant de 150 à 200 bases adénines à l'extrémité 3' de l'ARNpm. Cette queue poly-A possède un rôle dans l'exportation de l'ARNm hors du

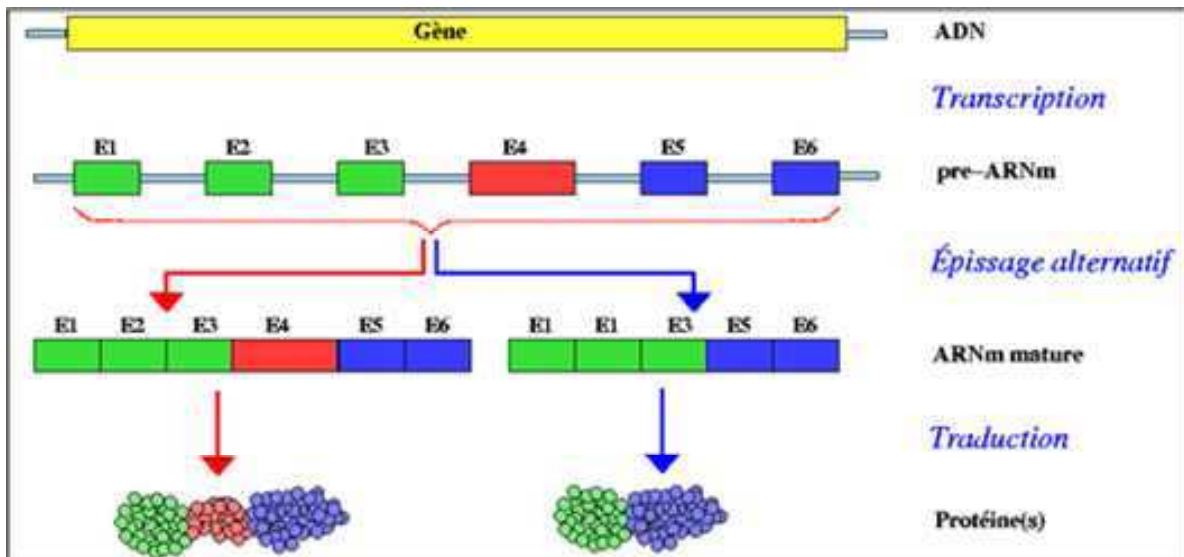


Figure 18: Principe de l'épissage alternatif. Le transcrit primaire permet la synthèse de différentes protéines selon les exons retenus pour la formation de l'ARN messager mature.

noyau, dans la protection de l'ARNm contre les ribonucléases cytoplasmiques et dans la fixation de l'ARNm aux ribosomes lors de la traduction.

2.3.2- Les modifications post-transcriptionnelles de l'ARNm

Lors des modifications post-transcriptionnelles ou maturation des ARNpm, qui se déroulent avant leur exportation dans le cytoplasme, l'ARNpm perd ses introns afin de former l'ARNm qui sera traduit en protéines. La maturation des ARNpm s'effectue par un mécanisme précis ; l'excision-épissage (Fig. 18). La séquence d'un intron commence par les bases GU et se termine par AG elles-mêmes entourées par des séquences particulières permettant une reconnaissance au nucléotide près. L'excision des introns chez les eucaryotes est catalysée par le spliceosome, un complexe de protéines et de petits ARN.

Le rôle des introns est encore mal connu, mais leur présence dans les gènes des organismes eucaryotes conduit, en 1977, à l'hypothèse de l'épissage alternatif ; un gène peut coder pour plusieurs polypeptides (Fig. 18). Palmer et Logsdon (1991) ont observé une corrélation entre la densité d'introns dans l'ADN et la complexité d'un organisme. En effet, en moyenne, chez les eucaryotes simples (*Plasmodium*), on observe un intron par kb de séquence codante, 3-4 introns par kb chez les plantes et les champignons et jusqu'à 6 chez les animaux supérieurs. Ainsi, les introns permettraient une complexification des organismes en augmentant dans des proportions raisonnables la quantité de matériel génétique.

2.4- Régulation de l'expression de l'information génétique

Même si chaque cellule d'un organisme possède le génome de l'organisme au complet, elle n'exprime que les gènes nécessaires au maintien de son intégrité et à sa fonction. Il existe donc un système de contrôle de l'expression des gènes.

Il existe deux sortes de gènes :

- Les gènes constitutifs sont exprimés en permanence. La boîte TATA en amont de ce type de gène est toujours accessible au complexe ARNpol/FT. Le taux intracellulaire de leurs produits est constant malgré leur turn-over.
- Les gènes régulés ne sont exprimés que dans certaines conditions et à des taux variables selon l'organe. La boîte TATA en amont d'un gène régulé est parfois inaccessible car cachée par un histone. Ce type de gènes est également sous l'influence de séquences

régulatrices, le plus souvent sous le contrôle des hormones, parfois situées loin des promoteurs, pouvant faciliter ou empêcher la fixation du complexe ARNpol/FT sur la boîte TATA. Par exemple, différents gènes sont exprimés lors des différents stades de l'ontogénèse (Sudre et al, 2002), certains gènes ne sont exprimés que durant la saison de reproduction ou encore en réponse à une modification de l'état physiologique lors d'un stress ou d'une activité physique (Oishi et al., 2002; González et al., 2000).

La régulation de l'expression de l'information génétique s'effectue également durant les modifications post-transcriptionnelles. L'épissage alternatif permet à partir d'un même gène d'obtenir des protéines différentes en fonction du rôle de la cellule dans laquelle il est exprimé. Par exemple, chez l'homme, le gène de la calcitonine conduit à un messager précurseur de la calcitonine dans la glande thyroïde alors que dans le cerveau il conduit à un neurotransmetteur. La stabilité des ARNm est également une forme de régulation post-transcriptionnelle en influant sur la durée de vie des ARNm.

2.5- Méthode d'étude du transcriptome

Les études du transcriptome ont pour but de caractériser et de quantifier les ARNm de manière à déterminer l'influence du niveau d'expression des gènes sur le phénotype. Afin de pouvoir appréhender le transcriptome dans son ensemble, la transcriptomique s'appuie sur des techniques de microarray pour un premier criblage, puis de quantification des ARNm.

Les techniques de Microarrays permettent d'étudier l'ensemble du transcriptome des cellules. Bai et al. (2003) ont développé des puces à ADN spécifique du muscle squelettique du porc permettant d'identifier les gènes impliqués dans le déterminisme des qualités de viande. Ces puces n'étant pas disponibles dans le commerce lors de la réalisation de l'analyse transcriptomique, j'ai utilisé la technique de Reverse Transcription Polymerisation Chain Reaction (RT-PCR) en temps réel, basée sur l'amplification de séquences spécifiques. Plus précise quant à la quantification de l'expression des gènes et également plus sensible et spécifique, elle fournit, néanmoins, moins d'informations. Elle ne permet pas de réaliser une analyse globale du transcriptome, mais seulement de gènes présélectionnés durant l'étude. Cette technique permet de détecter un minimum de 10 copies d'ADNc (Goerke et al., 2001) avec une variation de 1% (Wall et Edwards, 2002). Le nombre de copies d'ARNm se mesure par l'intensité de la fluorescence d'une molécule intercalante, le SYBR Green I. Le SYBR

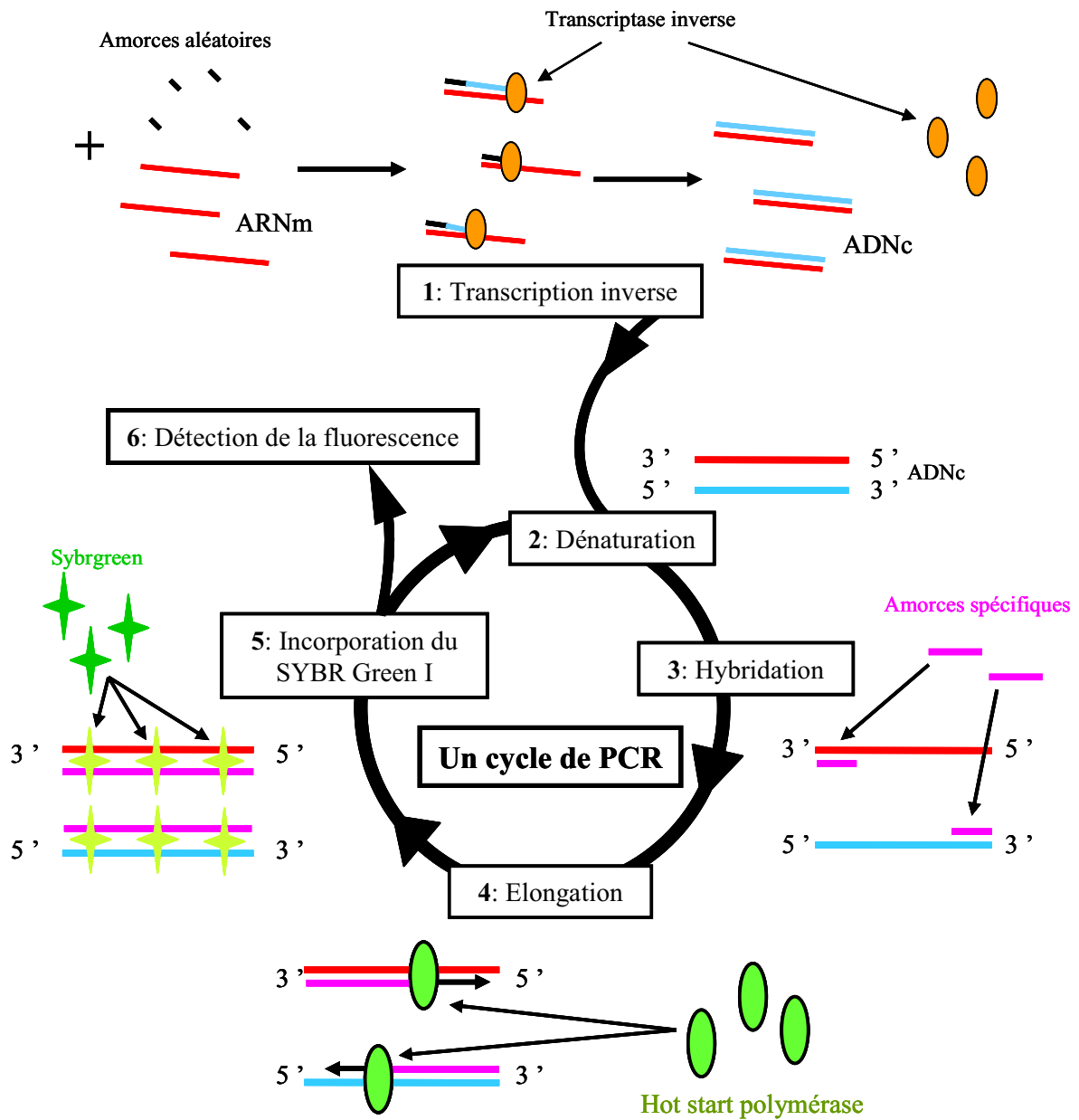


Figure 19: Principe de la RT-PCR quantitative.

Green I est un fluorochrome couramment utilisé, non fluorescent à l'état libre en solution mais excité lorsqu'il s'intercale dans un ADN double brin.

2.5.1- Le principe de la RT-PCR

a- La transcription inverse

Cette étape (Fig. 19) est catalysée par la transcriptase inverse, une enzyme isolée de rétrovirus ayant la capacité de synthétiser de l'ADN à partir d'ARNm. Elle permet donc d'obtenir de l'ADN complémentaire (ADNc) à partir du pool d'ARNm extrait des échantillons de muscle. La quantité totale des différents ADNc produits à partir des différents ARNm dépend de la quantité totale d'ARNm extraite. En utilisant des hexamères d'amorces, c'est-à-dire des amorces composées de 6 nucléotides dont l'enchaînement est réalisé de façon aléatoire, la transcription inverse permet l'obtention d'un pool d'ADNc représentatif du pool d'ARNm. L'objectif est de pouvoir comparer l'expression relative de plusieurs gènes entre échantillons. Par conséquent, avant toute quantification, des dilutions d'ADNc doivent être réalisées afin d'obtenir la même concentration dans chaque échantillon.

b- Les amorces spécifiques

Dans la mise au point de la réaction de PCR, le choix des amorces est crucial. Durant la PCR, les amorces vont avoir un double rôle : (1) en s'hybridant à l'ADNc matrice, elles délimitent la région d'ADNc à amplifier, (2) leur extrémité 3'OH étant libre elles servent de point de départ pour l'ADN polymérase. En effet, l'ADN polymérase utilisée dans la technique de PCR en temps réel a besoin d'ADN double brin pour initier la polymérisation du brin d'ADN complémentaire.

Les amorces sont de petits brins d'ADN d'environ 20 bases. Leurs séquences sont complémentaires d'une partie du gène d'intérêt, il est donc nécessaire de connaître la séquence du gène d'intérêt. Les amorces sont choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier. Des logiciels (Primer 3) permettent de choisir les séquences des deux amorces et permettent de vérifier les caractéristiques suivantes :

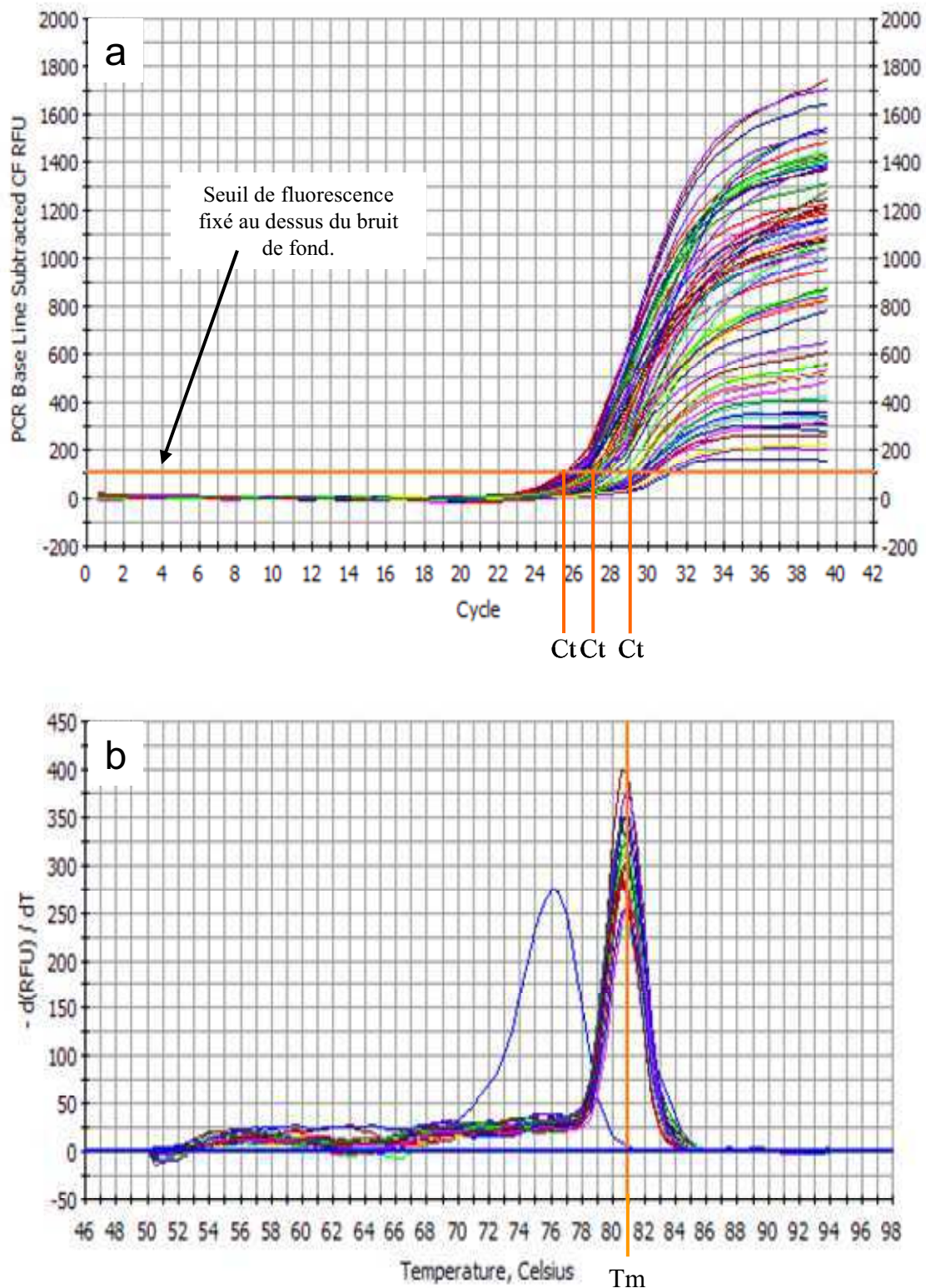


Figure 20: Résultats obtenus par RT-PCR quantitative.

- a: Ct, nombre de cycles à partir duquel le produit de PCR est détecté.
- b: T_m , la température de dénaturation des brins d'ADN.

- Des températures de fusion (T_m) comparables. Les oligonucléotides amorces doivent s'hybrider à l'ADNc matrice dans les mêmes conditions de température.
- Des séquences d'amorces qui ne soient pas complémentaires entre elles.
- Des séquences qui ne contiennent pas de séquences répétées inversées afin d'éviter des repliement intramoléculaire.

c- La PCR en temps réel

La PCR en temps réel est composée de 40 cycles permettant l'amplification d'un fragment d'ADNc d'environ 200 pb. Chaque cycle se compose de 4 étapes (Fig. 19) :

- La dénaturation : le mélange réactionnel est exposé à une température de 95°C pendant 10s permettant la séparation des deux brins d'ADNc.
- L'hybridation des amorces : le mélange réactionnel est exposé à une température de 62°C, pendant 10s permettant la fixation des amorces spécifiques sur les brins d'ADNc. La température d'hybridation (62°C) est légèrement supérieure à la température de fusion des amorces permettant ainsi une hybridation spécifique.
- L'élongation : le mélange réactionnel est exposé à une température de 72°C pendant 15s permettant la synthèse d'un brin complémentaire de l'ADNc matrice. Ainsi, par définition, en fin d'élongation, la quantité d'ADNc présent dans le mélange réactionnel est multipliée par deux. C'est également durant cette étape que le fluorochrome, le SYBR Green I s'intercale entre les deux brins d'ADN et devient fluorescent.
- Détection de la fluorescence : après l'élongation, le mélange réactionnel est exposé à une température de 85°C permettant la dénaturation des dimères d'amorces formés qui surestimerait les mesures. Le niveau de fluorescence mesuré, représentant la quantité de SYBR Green I intercalé dans l'ADN, est proportionnel au nombre de copies d'ADNc présent dans le milieu réactionnel.

La répétition de 40 fois de ces étapes permet donc une amplification de 2^{40} fois la quantité d'ARNm extrait et sa visualisation par la fluorescence

La RT-PCR permet d'obtenir deux types de résultats :

- Le Ct (Cycle Threshold) (Fig. 20a) : c'est le nombre de cycles à partir duquel le produit de PCR est détecté. Le Ct est proportionnel à la quantité d'ADNc présent dans le milieu

réactionnel. Ainsi un échantillon avec un Ct faible possède plus d'ADNc qu'un échantillon avec un Ct élevé.

- La température de fusion (T_m) (Fig. 20b) : c'est la température de dénaturation des brins d'ADN. A la fin des 40 cycles de PCR, une dernière étape consiste à mesurer la fluorescence du milieu réactionnel durant une augmentation progressive de la température. Elle permet de déterminer le T_m des brins d'ADN nouvellement formés et ainsi de vérifier qu'un seul fragment d'ADN a été amplifié.

d- Les limites de la RT-PCR

La RT-PCR en temps réel donne des résultats précis, fiables et reproductibles mais cette technique présente des contraintes à respecter pour l'exploitation des résultats. Premièrement, l'efficacité de la PCR doit, par convention, être supérieure à 95%. Elle rend compte du niveau d'amplification, qui est maximal quand il y a un doublement du nombre de copies d'ADN à chaque cycle de PCR. Deuxièmement ; les quantités d'ARN, étant variables d'un individu à l'autre, des gènes de référence sont utilisés pour normaliser les valeurs et permettre la comparaison d'échantillons. Ces gènes de référence sont des gènes dits de « ménage », car ils sont exprimés de façon constitutive. Leur expression est considérée comme constante d'un individu à l'autre et est utilisée comme référence pour la normalisation.

Le SYBR Green I, peu onéreux, a été utilisé car il s'applique à l'étude de l'ensemble des gènes, à la différence de la technique Taq Man qui nécessite l'utilisation d'une sonde interne à la région amplifiée.

L'inconvénient majeur de la technique de RT-PCR est l'étape de transcription inverse. En effet, l'absence de relecture du brin nouvellement synthétisé par la transcriptase inverse rend cette étape peu fidèle. Des mutations sont intégrées dans la séquence pouvant empêcher l'hybridation des amorces spécifiques et biaiser les résultats.

2.5.2- Apport de la transcriptomique dans l'étude des qualités de viande

Pour comprendre l'origine des variations dans les qualités des viandes, les scientifiques avaient l'habitude d'étudier l'expression d'un gène isolé. Ces techniques ne permettaient pas d'appréhender les interactions pouvant exister entre les gènes. De nos jours, le développement

de l'outil transcriptomique, avec la création des puces à ADN, permet une détection plus globale des gènes exprimés différemment entre deux génotypes ou conditions d'élevage. L'expression de ces gènes pourra par la suite être reliée aux variations observées dans les paramètres de qualités des viandes.

Dans le cadre du projet MUGENE, il a été mis en évidence, chez le taurillon de race Charolaise, qu'un gène (DNAJA1) dont le niveau d'expression, dans le muscle long dorsal à l'abattage, est négativement corrélé à la note de tendreté de la viande appréciée par un jury d'analyse sensorielle après 14 jours. Les variations de l'expression de ce gène expliquent à elles seules près de 65 % de la variabilité de la tendreté. Ce résultat a fait l'objet d'un dépôt de brevet (Bernard et al., 2006 ; 2007). DNAJA1 code pour une protéine appartenant à la famille des heat shock protéins de 40kDa. Cette protéine jouerait un rôle dans l'importation des protéines dans la mitochondrie. D'autres études sont, cependant, nécessaires pour confirmer l'importance de ce gène dans le déterminisme de la tendreté de la viande bovine.

En Australie, des gènes différemment exprimés ont été mis en évidence entre les bovins de race Holstein et des bovins de race Noire Japonaise caractérisée par une viande persillée, c'est-à-dire riche en lipides intramusculaires. Les gènes préférentiellement exprimés chez les Noirs Japonais sont impliqués dans la mise en place du tissu adipeux ou la synthèse des lipides tandis que les gènes exprimés chez les bovins Holstein sont plutôt impliqués dans le développement du muscle ou les caractéristiques du tissu conjonctif (Wang et al., 2005)

Chez le porc, le déterminisme de la teneur en lipides intramusculaires (LIM) a été étudié. En utilisant les données du programme AGENAE (Hatey et al., 2000) comportant un millier de séquences d'ADNc, les transcriptomes de muscle de porcs F2 Duroc x Large White à teneur élevée ou basse en LIM ont été comparés (Damon et al., 2002). Entre ces deux lots, 8 gènes semblent être différemment exprimés. Actuellement, la relation entre la fonction de ces protéines et le déterminisme de la teneur en LIM n'est pas clairement établie.

La recherche de prédicteurs précoces et de QTL associés aux défauts de la qualité de la viande de porc à travers l'analyse du transcriptome est un programme qui associe 4 laboratoires INRA, ENV de Lyon et FRANCE HYBRIDES (Damon et al., 2002). L'objectif de ce programme est de mettre en relation le profil d'expression des gènes et des protéines musculaires, les caractéristiques physico-chimiques du muscle et la qualité de la viande.

Un projet européen Quality Pork Genes (Plastow et al., 2000) s'attache à identifier des gènes responsables de la variation de la qualité de la viande de porc en relation avec le stress et le bien-être animal. Il repose sur l'utilisation des techniques transcriptomiques et protéomiques. Les objectifs principaux sont la construction d'une base de données de mesures

phénotypiques du muscle et de la viande, la production d'une banque d'ADNc musculaire et de puces à ADN et l'identification de marqueurs de la qualité de la viande.

Le différentiel d'expression des gènes n'indique pas nécessairement la cause de l'apparition d'une particularité qualitative des viandes. Mais elle ouvre des pistes pour expliquer les mécanismes sous jacents aux propriétés des muscles et des viandes. Mon étude se propose de mettre en relation l'expression de certains gènes, sélectionnés sur la base de l'étude protéomique, reflétant des évènements *post-mortem* biochimiques impliqués dans le déterminisme des qualités de la viande de porc. Les paramètres de qualités des viandes étant influencés par de nombreux facteurs comme l'origine génétique ou les conditions d'élevage, mon étude s'attache à prendre en compte ces paramètres et d'étudier leur influence sur les mécanismes de déterminisme des qualités des viandes.

CHAPITRE 1

**Pig Longissimus lumborum proteome: Part I:
Effects of genetic background, rearing environment and
gender.**

Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Meat Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meatsci

Pig *Longissimus lumborum* proteome: Part I. Effects of genetic background, rearing environment and gender

A. Kwasiborski^a, T. Sayd^a, C. Chambon^a, V. Santé-Lhoutellier^a, D. Rocha^b, C. Terlouw^{a,*}

^aUR370 Qualité des Produits Animaux, INRA de Theix, F-63122 St. Genès Champanelle, France

^bGenus plc, Genus Cambridge Research Laboratory, Department of Pathology, University of Cambridge, CB2 1QP Cambridge, United Kingdom

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 October 2007

Received in revised form 14 February 2008

Accepted 28 April 2008

Available online xxx

Keywords:

Pig

Proteome

Meat quality

Longissimus lumborum

2D-electrophoresis

ABSTRACT

A $2 \times 2 \times 2$ factorial experiment on *Longissimus lumborum* of 24 pigs found that rearing environment (indoors or outdoors), breed of sire (Duroc or Large White), and gender (female or castrated male) influenced 22, 10, and 88 proteins of the soluble fraction, respectively, containing 220 matched spots in total. Some proteins were influenced by more than one main effect. Outdoor rearing resulted in lower levels of enzymes of the glycolytic pathway suggesting a more oxidative metabolism. Breed of sire slightly altered the balance of enzymes of the glycolytic pathway. Gender had profound effects. In particular, different enzyme levels suggest a more lipid oriented energy metabolism, and a higher extractability of myofibrillar proteins suggest altered control of the contractile apparatus, in castrated males. Differences in extractability did not explain the profound gender effects. Glycogen content, ultimate pH, drip and thawing losses showed main or interactive effects of the three treatment factors.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Technological and sensory pork quality depends on genetic and rearing background of the pigs used (Bee, Guex, & Herzog, 2004; Enfält, Lundstrom, Hansson, Lundeheim, & Nystrom, 1997; Terlouw & Rybarczyk, 2008). Oxidative and proteolytic processes in the *post-mortem* muscle determine to a large extent meat quality (Bendall, 1973; Rowe, Maddock, Lonergan, & Huff-Lonergan, 2004; Taylor et al., 1995). Proteins are central in these reactions as enzymes, but also as targets of oxidative and proteolytic activities. It is likely that variations in protein levels mediate the effects of genetic and rearing background on meat quality. The objective of our work was to use proteomics to increase our understanding of the role of certain proteins or of the biochemical cellular events they mirror, in animal and environment-related influences on meat quality. Proteomic studies screen a chosen fraction of the cellular protein content at a given moment, generally containing several

hundred proteins. Use of this technique has proven useful to identify proteins that play a central role in meat quality. For example, they allowed to identification of proteins whose levels differed according to pork colour, drip loss or shear force (Hwang et al., 2004; Laville et al., 2007; Sayd et al., 2006). Such results may help to understand cellular mechanisms underlying variation in meat quality.

The present paper reports the effects of genetic background, rearing environment and gender on protein levels in longissimus muscle samples obtained immediately after slaughter. The evaluation of relationships between protein levels and longissimus meat quality parameters will be reported in a separate paper (Kwasiborski et al., *accepted for publication*). The study uses the soluble cellular fraction that contains enzymes and regulators of protein expression.

2. Materials and methods

2.1. Animals, housing and slaughter

Ten Large White \times Landrace sows were inseminated with mixed semen from PIC Duroc and Large White sires. From about 100 piglets used for a larger study on behaviour, physiology and meat quality (Terlouw, Berne, & Astruc, *submitted for publication*), 48 have been selected, based on parenthood and weight. Pigs were born on the site in an outdoor farrowing system. They were weaned at 4 weeks and kept indoors until fattening at 2 months

Abbreviations: α Parv, parvalbumin alpha; PPP, pyridoxal phosphate phosphatase; HSP72, heat shock protein 72 kDa; GDI2, guanosine diphosphate dissociation inhibitor 2; ACYL, aminoacylase I; ALDH, aldehyde dehydrogenase; PKM1, pyruvate kinase isoform M1; β -ENO3, β -enolase 3; cG3PDH, cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase; CGI-29, CGI-29 protein; PRDX6, peroxiredoxin 6; TPI, triosephosphate isomerase; PGAM1, phosphoglycerate mutase 1; MB, myoglobin; COF 2, cofilin 2.

* Corresponding author. Present address: INRA de Theix, UR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès Champanelle, France. Tel.: +33 (0) 473 62 45 69; fax: +33 (0) 473 62 41 18.

E-mail address: Claudia.Terlouw@clermont.inra.fr (C. Terlouw).

of age. Half of each genetic type was fattened indoors in four 2.2×2.9 m pens with slatted floors in a heated and ventilated animal room of 4×8.8 m. The other half was fattened outdoors on 850 m^2 parcels with little grass. Each parcel contained a 7.5 m^2 hut, a trough, a bowl drinker and a mud hole with water, as a bathing opportunity. There were six pigs (three females, three castrated males) for a single breed of sire per pen or parcel. Pigs were put into the fattening system in April and slaughtered in October. Outdoor pigs were fed *ad libitum*, indoor pigs were slightly restricted in order to standardise slaughter weight at similar ages. Liquefied food was distributed at 0600 h and 1800 h.

Pigs were slaughtered at about 8 months of age in a small local abattoir after a fasting period of 24 h. They were stunned on the floor with manually operated low voltage tongs. Slaughter took place on two different days, at a 1-week interval, balanced for housing system and breed of sire. Five minutes after bleeding, a 5 g sample of the *Longissimus lumborum* (LL) was excised and immediately frozen in liquid nitrogen. Upon arrival at the laboratory, the cups were stored at -80°C until use for the proteomic study. Muscle temperatures of the LL were measured at 15 and 45 min after bleeding. Samples were also taken 45 min after bleeding to measure pH and for later assay of lactate and glycogen contents. pH was measured on the spot (glass electrode: Inlab 427, Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland, connected to a portable pH meter: Schött-Geräte, Germany) after immediate homogenisation of the sample in 18 ml of 5 mM iodoacetate.

Twenty-four hours after slaughter, a 1-g sample was taken from each muscle for subsequent lactate and glycogen assays. Temperature, pH, redness (a'), yellowness (b') and lightness (L') were recorded directly on the muscle. Colour was measured using a Minolta Chromameter (CR-300, Minolta Corp., Osaka, Japan) equipped with a 0° viewing angle and using illuminant C.

To evaluate drip losses, a 2-cm-thick slice of the LL was cut at the level of the last rib 24 h after slaughter, suspended in a plastic bag and left at 4°C (Honikel, 1998). The amount of water lost was measured 72 h (drip loss d3) and 120 h later (drip loss d5) and expressed as a percentage of the initial sample weight. To evaluate thawing losses, a 7-cm-thick sample was subsequently cut from the LL, weighed, vacuum packed, and frozen after ageing (4 days after slaughter). About 4 weeks later, samples were thawed overnight at $+4^\circ\text{C}$, unpacked, blotted and weighed. Thawing losses were expressed as the percentage of the initial sample weight. Samples were subsequently cut to a standardised size ($5 \times 8 \times 4$ cm), weighed and vacuum packed. They were then heated in a water bath at 70°C for 50 min and cooled in a $+4^\circ\text{C}$ water bath. They were then unpacked and weighed after removal of liquid and precipitated protein. Cooking losses were expressed as the percentage of the initial weight of the standardised-cut sample.

2.2. Glycogen and lactic acid assays

About 200 mg of lyophilised muscle was ground and suspended in 10 ml of perchloric acid 0.5 M. After hydrolysis of the glycogen by amyloglucosidase (Bergmeyer, 1974), glucose content of the homogenate was determined. Lactic acid was determined on the supernatant after centrifugation (20 min at 2500g) of the perchloric homogenate following Bergmeyer (1974) procedure. Glycolytic potential (GP), the sum of compounds likely to produce lactic acid *post-mortem*, was calculated using the formula proposed by Monin and Sellier (1985). Concentrations are expressed as μmol lactate equivalents/g of fresh tissue.

Only 24 pigs were used for the present study. Pigs were selected according to their glycolytic potential and ultimate pH ($r = -0.60$, $p < 0.0001$). Males and females were represented with different symbols in a scatter plot and the three highest and three lowest values were selected for each genetic type and each rearing system,

while balancing for gender. Thus, if for a given genetic type and rearing system, two higher and one lower values were selected for castrated male pigs and one higher and two lower values were selected for female pigs, the reverse was done for the other genetic type and rearing system (Fig. 1).

2.3. Sarcoplasmic protein extraction, two-dimensional electrophoresis and image analysis

Protein extraction, electrophoresis and image analysis were carried out according to the procedure described by Sayd et al. (2006). Frozen muscle was homogenised at 4°C using a glass bead agitator (Retsch, Haan, Germany) in a buffer made of 40 mM Tris-HCl (pH 8.8), 2 mM EDTA, and a protease inhibitor cocktail for mammalian tissues, containing AEBSF, Aprotinin, Leupeptin, Bestatin, Pepstatin A and E-64 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA). This buffer was chosen for its weak ionic strength, limiting extraction of the actomyosin complex (Lametsch et al., 2006). Due to the proportion of protein content it represents, actomyosin, had it been extracted, would mask a large number of the proteins of interest for this study (Sayd et al., 2006). The homogenate was centrifuged (4°C , 10 min, 10,000g) and the supernatant, referred to as the soluble fraction, was stored at -80°C . The protein content was determined using the Bradford method (Bradford, 1976).

For electrophoresis, 900 μg of soluble proteins suspended in a urea 7 M, thio-urea 2 M and CHAPS 2% buffer were loaded onto immobilised pH gradient strips of 17 cm (pH 5–8, Biorad, Hercules, USA). Isoelectric focusing was performed using a Protean IEF cell system (Biorad). Gels were passively rehydrated for 16 h before application of rapid voltage ramping to reach a total of 85 kV h. For the second dimension, proteins were separated on 12% sodium

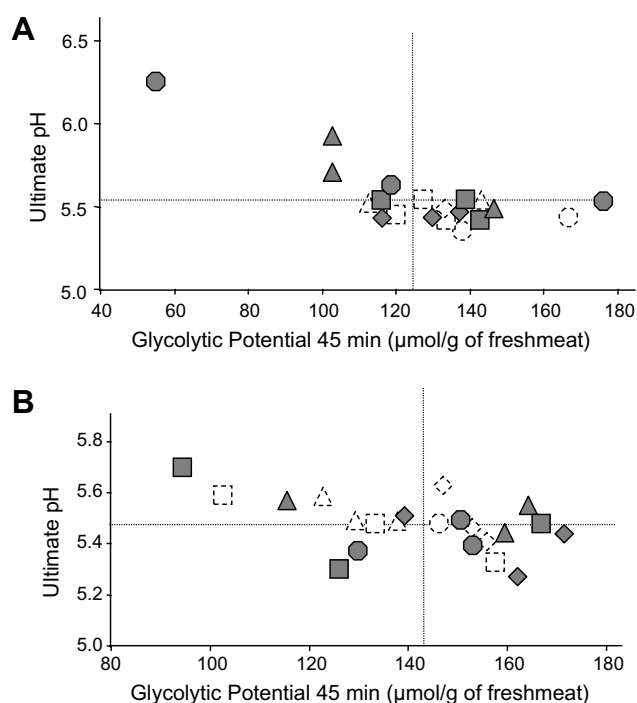


Fig. 1. Scatter plot showing glycolytic potential and ultimate pH for indoor/Duroc-sired (triangles), indoor/Large White sired (diamonds), outdoor/Duroc-sired (squares) and outdoor/Large White sired (circles) for (A) castrated males and (B) females of the original experiment (Terlouw et al., submitted for publication). Grey and white symbols indicate selected and non-selected samples, respectively, for the present experiment. Horizontal and vertical lines indicate average values of the ultimate pH and glycolytic potential calculated over the 48 pigs that finished the original experiment.

dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) gels using Protean II XL system (Biorad). Gels were stained with Coomassie Blue G250 (colloidal blue; Neuhoff, Arold, Taube, & Ehrhardt, 1988) and were produced in triplicate, resulting in the production of 72 gels.

Gels were scanned and analysed using the two-dimensional electrophoresis image analysis software PDQuest (Biorad). Gels were matched creating a master gel, which contained only spots present on at least two of the three gels created per sample. Each matched spot was normalised by expressing its relative quantity relative to the total quantity of matched spots, in ppm. For one sample and one spot the mean value calculated over the three gels was used for statistical analysis. An example of a gel can be found in Fig. 2.

2.4. Protein identification by mass spectrometry

Spots of interest were excised, and the proteins were subjected to in-gel tryptic digestion and peptide extraction using a Montage In-Gel Digest96 ZP kit (Millipore, Billerica, USA). Excised spots were washed using a 25 mM ammonium bicarbonate (NH_4HCO_3) and 5% (v/v) acetonitrile (ACN) solution and destained with a 25 mM NH_4HCO_3 and 50% (v/v) ACN solution. The spots were dehydrated using a 100% ACN solution and the proteins were digested overnight with a solution of 10 ng/ μl trypsin (V5111, Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) in 25 mM NH_4HCO_3 buffer (37 °C). The peptides were extracted using a 100% ACN solution and analysed using a matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometer Voyager DE-Pro model (Perspective BioSystems, Farmingham, MA, USA). External calibration was performed with a standard peptide solution (Proteomix, Laser-Bio Labs, Sophia-Antipolis, France). Internal calibration was performed using peptides resulting from auto-digestion of porcine trypsin. Proteins were identified from their peptide mass fingerprinting and searching the National Center for Biotechnology Infor-

mation (NCBI) protein sequence database using the MASCOT and PROFOUND softwares (<http://www.matrixscience.com> and <http://prowl.rockefeller.edu>). The initial search parameter allowed a single trypsin missed cleavage, carbamidomethylation of cysteine, partial oxidation of methionine, and a mass accuracy of 25 ppm.

2.5. Statistical analysis

Statistical procedures and analysis were carried out using XLstat addinsoft version 7.5.3 (Microsoft Corporation, Seattle, USA). Intensity-dependent normality of the distribution was verified according to Meunier et al. (2005). Normal distribution of data was verified using the Shapiro–Wilk test and proteins with abnormal distributions were normalised using the Box–Cox procedure. In the latter case, effects are presented only if both untransformed and transformed data were significantly influenced.

Differences in meat quality parameters or in protein levels were identified using an analysis of variance testing the effects of breed of sire, rearing environment, gender, and their two-way interactions. Relationships between overall extractability (estimated by the Bradford values) and protein levels were studied by Pearson correlations. Where significant, Bradford values have been introduced as covariate into the analysis of variance and results of these analyses (i.e. on protein levels corrected for Bradford values) are also reported. Similarly, values of ultimate pH and glycolytic potential were introduced as covariate to determine whether treatment effects on proteins were due to variations in these variables.

3. Results

3.1. Meat quality

Nine out of the fifteen measured meat quality parameters were not influenced by any of the three treatment factors or their interactions (Table 1). Rearing environment had no main effects on

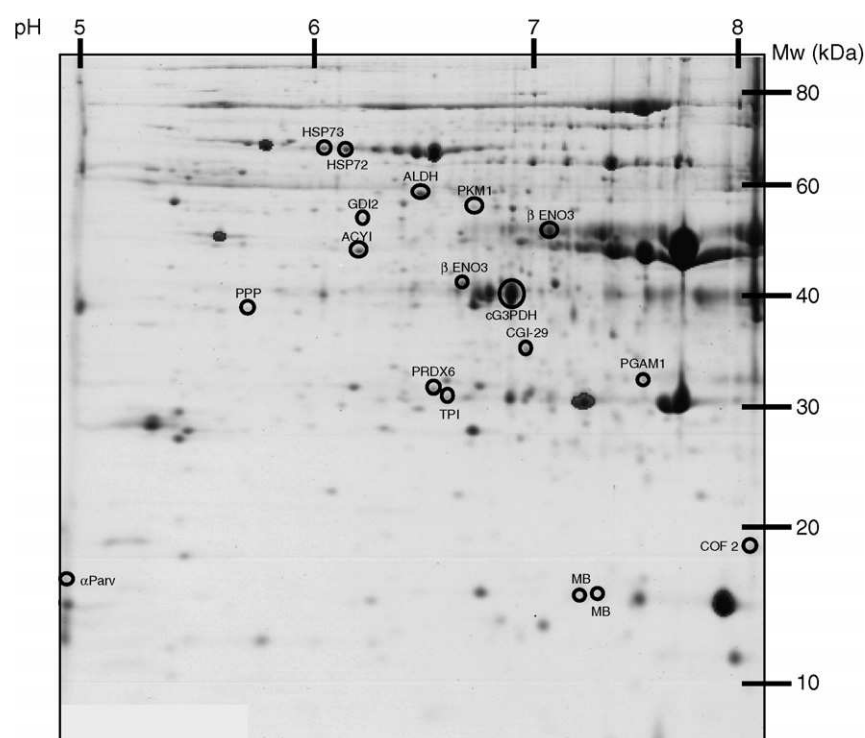


Fig. 2. Picture of a representative two-dimensional gel of protein spots found in the utilised soluble fraction. Proteins identified by mass spectrometry and showing different levels according to rearing environment or breed of sire are in circles.

Table 1
Effects of treatment factors and their interactions on meat quality parameters

	Rearing environment				Breed of sire		Gender		Rearing environment × Breed of sire				Breed of sire × Gender			
	Outdoor		Indoor		Duroc	Large White	Castrated male	Female	Outdoor × Duroc	Outdoor × Large White	Indoor × Duroc	Indoor × Large White	Duroc × Castrated male	Duroc × Female	Large White × Castrated male	Large White × Female
	6.57 ± 0.16	47.77 ± 17.54	6.51 ± 0.16	47.80 ± 13.78	6.53 ± 0.18	46.06 ± 15.56	6.58 ± 0.15	42.94 ± 16.62	6.52 ± 0.13	48.21 ± 14.24	6.57 ± 0.21	40.06 ± 17.67	6.61 ± 0.18	38.88 ± 12.53	6.45 ± 0.13	47.00 ± 19.05
45 min pH	38.13 ± 12.59	38.21 ± 11.79	34.95 ± 9.13	41.4 ± 13.91	35.98 ± 11.46	40.36 ± 12.52	38.78 ± 9.86 ^b	37.49 ± 17.66 ^b	37.49 ± 17.66 ^b	45.30 ± 10.76 ^c	31.12 ± 9.86 ^a	39.23 ± 6.89 ^a	31.12 ± 9.86 ^a	30.66 ± 9.08 ^a	54.26 ± 15.65	45.12 ± 10.93
Lactate	131.69 ± 30.56	133.84 ± 19.77	130.37 ± 21.33	135.16 ± 29.34	123.3 ± 28.21	142.22 ± 18.77	127.59 ± 20.41	140.09 ± 38.04	140.09 ± 38.04	145.6 ± 15.03	122.08 ± 21.87	124.13 ± 17.60	124.13 ± 17.60	136.60 ± 22.86	122.47 ± 35.79	147.85 ± 10.91
Glycogen potential	39.26 ± 0.48	38.73 ± 0.96	38.96 ± 0.94	38.95 ± 0.72	38.8 ± 0.58	39.12 ± 1.02	38.85 ± 0.58	38.60 ± 0.34	38.60 ± 0.34	38.8 ± 0.77	38.65 ± 1.10	39.02 ± 0.38	39.02 ± 0.38	38.88 ± 1.40	38.54 ± 0.66	39.28 ± 0.59
Temperature	5.56 ± 0.22	5.53 ± 0.16	5.56 ± 0.14	5.53 ± 0.24	5.52 ± 0.23 ^{ab}	5.47 ± 0.09	5.50 ± 0.05 ^a	5.62 ± 0.33 ^b	5.62 ± 0.33 ^b	5.45 ± 0.10 ^a	5.62 ± 0.18 ^b	5.60 ± 0.20	5.60 ± 0.20	5.53 ± 0.05	5.66 ± 0.30	5.41 ± 0.09
24 h pH	72.38 ± 13.93	71.94 ± 8.07	72.38 ± 7.22	71.94 ± 14.39	66.71 ± 12.94	77.61 ± 5.71	69.30 ± 4.07	74.58 ± 18.77	74.58 ± 18.77	76.69 ± 6.91	67.18 ± 8.29	68.33 ± 7.54	68.33 ± 7.54	76.43 ± 3.82	65.10 ± 16.51	78.78 ± 6.92
Lactate	11.31 ± 4.03	10.52 ± 3.45	9.88 ± 2.89	11.96 ± 4.24 ^a	9.4 ± 3.48	12.44 ± 3.43 ^{abc}	11.55 ± 2.65 ^b	11.07 ± 5.64 ^b	11.07 ± 5.64 ^b	12.84 ± 3.06 ^b	8.21 ± 2.52 ^a	10.02 ± 3.20 ^a	10.02 ± 3.20 ^a	9.73 ± 2.54 ^a	8.77 ± 3.64 ^a	15.14 ± 1.54 ^{ab}
Glycogen	4.52 ± 2.35	4.17 ± 1.88	3.38 ± 1.13	5.21 ± 2.43 ^a	3.59 ± 1.84	5.15 ± 2.12	2.89 ± 1.09	5.45 ± 2.95	5.45 ± 2.95	4.64 ± 1.71	3.70 ± 0.90	3.28 ± 1.39	3.28 ± 1.39	3.51 ± 0.69	3.90 ± 2.15	6.51 ± 1.93
Water loss	2.17 ± 0.93	2.15 ± 0.74	2.04 ± 0.76	2.27 ± 0.89	1.99 ± 0.78	2.34 ± 0.87	1.98 ± 0.67	2.32 ± 1.11	2.32 ± 1.11	2.49 ± 0.60	1.81 ± 0.83	1.99 ± 0.59	1.99 ± 0.59	2.10 ± 0.92	2.00 ± 0.93	2.54 ± 0.77
Drip loss d3	18.48 ± 4.43	19.85 ± 3.27	18.11 ± 3.73	20.23 ± 3.88	18.31 ± 4.32	20.03 ± 3.33	18.75 ± 3.80	20.95 ± 4.76	20.95 ± 4.76	19.53 ± 2.54	20.17 ± 3.54	16.80 ± 3.29	16.80 ± 3.29	19.42 ± 3.68	19.82 ± 4.69	20.63 ± 2.81
Cooking loss	12.18 ± 2.62	13.24 ± 3.51	11.68 ± 2.11	13.73 ± 3.63 ^a	11.3 ± 3.17	14.12 ± 2.38 ^{abc}	12.79 ± 1.04 ^a	11.57 ± 3.81 ^a	11.57 ± 3.81 ^a	15.89 ± 2.42 ^b	10.58 ± 2.59 ^a	10.87 ± 2.48	10.87 ± 2.48	12.50 ± 1.20	11.72 ± 3.69	15.74 ± 2.16
Thawing loss	53.01 ± 6.13	51.74 ± 3.94	52.07 ± 4.62	52.68 ± 5.69	51.48 ± 5.98	53.27 ± 4.06	50.29 ± 4.35	53.19 ± 7.40	53.19 ± 7.40	50.57 ± 4.17	50.57 ± 4.17	51.23 ± 3.79	51.23 ± 3.79	52.91 ± 5.19	51.73 ± 7.56	53.63 ± 2.40
Colour L _a	8.10 ± 1.60	8.5 ± 1.81	8.35 ± 1.97	8.24 ± 1.42	7.96 ± 1.89	8.64 ± 1.46	8.29 ± 1.53	8.71 ± 1.60	8.71 ± 1.60	7.75 ± 2.32	7.75 ± 2.32	7.89 ± 2.19	7.89 ± 2.19	8.82 ± 1.58	8.03 ± 1.51	8.45 ± 1.29
a	4.84 ± 2.07	4.02 ± 1.49	4.37 ± 1.90	4.49 ± 1.80	4.1 ± 2.04	4.76 ± 1.58	3.83 ± 1.76	4.20 ± 2.35	4.20 ± 2.35	3.39 ± 1.89	3.39 ± 1.89	4.17 ± 1.99	4.17 ± 1.99	4.57 ± 1.79	4.02 ± 2.08	4.95 ± 1.31
b																

No rearing conditions, breed of sire interactions were found and therefore, data are not presented

Main effects: **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001.

Interactive effects: ^{abc}, different subscripts indicate significant differences between treatment groups (*p* < 0.05).

meat quality parameters, but showed interactions with breed of sire. Glycogen content (45 min and/or 24 h), ultimate pH, drip loss d3 and thawing loss showed main or interactive effects of the three treatments factors.

3.2. Proteins

Approximately 600 protein spots were detected on each gel. Selection of clearly defined spots present on at least two of the three gels of each pig, allowed creation of a master gel containing 220 spots. This is a normal quantity for the conditions chosen for this study (pH gradient 5–8, a molecular weight range of 10–100 kDa, and Coomassie Blue staining). Of these matched spots, 137 protein spots showed a difference in expression according to one or several treatments. Eighty-nine proteins were influenced by only one factor (Table 2). Gender influenced the expression of many more proteins than rearing environment or breed of sire.

Of the matched spots, 94 were successfully identified by mass spectrometry (Tables 3–6). The remaining proteins were either not in the databases or the protein quantity in the excised spots was too low to allow identification by the mass spectrometer.

3.3. Effect of rearing environment

Ten out of the twenty-two proteins showing different levels according to rearing conditions were overrepresented in indoor pigs (Table 3). Of these, three were enzymes of the glycolytic pathway. Phosphoglycerate mutase 1 (PGM1), which catalyses the conversion of 3-phosphoglycerate into 2-phosphoglycerate, had 1.3-fold higher levels in indoor pigs. Triosephosphate isomerase (TPI), which catalyses the reversible interconversion of dihydroxyacetone phosphate and glyceraldehyde-3-phosphate, and the β isoform of enolase 3 (ENO3β), catalysing the conversion of 2-phosphoglycerate to phosphoenolpyruvate, had near 1.5-fold higher levels in indoor pigs. Aldehyde dehydrogenase (ALDH) involved in the clearance of potentially toxic aldehydes and peroxiredoxin 6 (PRDX6) a powerful antioxidant, were overrepresented by 1.3- and 1.5-fold, respectively in indoor pigs. ALDH was correlated (*p* < 0.05) with the Mb isoforms (*r* = -0.54 and *r* = -0.47) and (*p* = 0.001) with PRDX6 (*r* = 0.64). Cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase (cG3PDH) had slightly (1.1-fold) but significantly higher levels in indoor pigs. cG3PDH allows entry of glycerol into the glycolytic pathway. It oxidises glycerol 3-phosphate to dihydroxyacetonephosphate, which then enters glycolysis via TPI. Pyridoxal phosphatase (PLP phosphatase) had 1.2-fold higher levels in indoor pigs. This enzyme catalyses the dephosphorylation of pyridoxal 5'-phosphate, the coenzymatically active form of vitamin B6, which plays a vital role in the function of approximately 100 enzymes involved in essential chemical reactions in the human body, including glycolytic reactions (Jang et al., 2003). Three unidentified proteins were also overrepresented in indoor pigs.

Four chaperone or regulator proteins had 1.3- to 2.4-fold higher levels in outdoor pigs. Heat Shock Protein 72 kDa (HSP72) is endogenously expressed but levels rise during stress and therefore, it is sometimes described as the inducible isoform of the HSP70 family (González, Hernando, & Manso, 2000; Oishi et al., 2002). It ensures that newly synthesised proteins are folded and function correctly and facilitate rapid recovery and remodelling if damage occurs due to stress (McArdle, Vasilaki, & Jackson, 2002; Thompson, Maynard, Morales, & Scordilis, 2003). Guanosine diphosphate dissociation inhibitor 2 (GDI2) is an essential regulator of Rab protein involved in the formation and transport of vesicles (Gurkan et al., 2005; Pylypenko et al., 2006). α-b-Crystallin (α-b-crys) is a small heat shock protein, and CGI29-protein (CGI29) (APAF1 interacting protein or APIP) exhibits a mitochondrial anti-apoptotic and anti-ischemic activity (Cho et al., 2004).

Table 2
Number of protein spots influenced by treatment factors or their interactions

	Factors				Interactions		
	Rearing	Sire	Gender		Rearing × sire	Rearing × gender	Sire × gender
Total	22	10	88	Total	4	13	17
Spots affected by one factor	11	6	72	Spots influenced by only one interaction	3	7	8

Proteins with similar chemical identifications and MW found at different pI locations are believed to correspond to different isoforms (Hamelin et al., 2006). Two isoforms of the oxygen storage protein myoglobin (**Mb**) had near 2-fold higher levels in outdoor pigs. Cofilin is involved in the regulation of actin in non-muscle and muscle tissues. It binds, independently of cytoplasmic Ca^{2+} levels, to actin monomers, inhibiting polymerisation, and to actin polymers (in skeletal muscle representing 87–89%; Seidel, Snabes, & MacLeod, 1981), where it competes with other actin binding molecules, including tropomyosin and myosin (Lehman, Craig, & Vibert, 1994; Vibert, Craig, & Lehman, 1993). At higher pH values it severs actin filaments (Yonezawa, Nishida, & Sakai, 1985). An isoform of cofilin 2, expressed in muscle tissues, and an isoform of actin (1336) had 2.5-fold and 2-fold higher levels in outdoor pigs, respectively. Four unidentified proteins were also overrepresented in outdoor pigs. The effects of rearing environment on protein content were not related to variations in glycolytic potential or ultimate pH, as introduction of these covariates into the analysis of variance did not remove effects.

3.4. Effects of genetic background

Only two proteins, ENO3 β (a different spot from the one influenced by rearing environment) and alpha parvalbumin (α PARV) were overrepresented in Large White-sired pigs, with 1.3- and 1.6-fold increases, respectively, compared to Duroc-sired pigs (Table 4). α PARV is found at high concentrations in fast contracting/relaxing skeletal muscle fibres and is involved in muscle relaxation due to its high affinity for Ca^{2+} (Müntener, Käser, Weber, & Berchtold, 1995). A M1 isoform of pyruvate kinase (**PKM1**), the last enzyme of the glycolytic pathway, had 2.2-fold higher levels in Duroc-sired pigs. HSP73 is part of the HSP70 family and sometimes described as constitutively expressed. Levels may, however, rise in response to (heat) stress (Oishi et al., 2002). Duroc-sired pigs had 1.6-fold higher HSP73 levels. HSP73 was correlated ($p < 0.05$) with α PARV ($r = -0.50$) and the PKM1 isoform ($r = 0.54$). The breed effect on HSP73 might be related to variations in glycolytic potential as introduction of this covariate (near-significant in the model: $p = 0.08$) into the analysis of variance removed partly the breed effect ($p = 0.10$). ALDH9 had a 1.4-fold higher level in Duroc-sired pigs. Aminoacylase 1 (**ACY1**), a homodimeric zinc-binding cytosolic metalloenzyme with a wide range of tissue expression, cleaving acylated L-amino acids (except L-aspartate) into L-amino acids and an acyl group (Liaw et al., 2003), had 1.3-fold higher levels in Duroc-sired pigs. Four unidentified proteins were also overrepresented in Duroc-sired pigs.

3.5. Effects of gender

Gender was the most influencing factor (Tables 1 and 2), with approximately equal amounts of proteins overrepresented in female and castrated male pigs (Table 5). Fourteen of these proteins concerned the glycolytic pathway showing 1.2- to 2.2-fold levels in females. These proteins involve PGM1, 3-phosphoglycerate kinase (**PGK**), an enzyme that transfers a phosphate group from 1,3-biphosphoglycerate to ADP, forming ATP and 3-phosphoglycerate, three different isoforms of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (**GAPDH**), which catalyses the sixth step of glycolysis by adding inorganic phosphate to glyceraldehyde-3-phosphate to form 1,3-bisphosphoglycerate, PKM1 (another spot than the one influenced by breed of sire), two different isoforms of TPI and five different isoforms of ENO3 β . Another isoform of ENO3 β had 1.4-fold higher levels in castrated males. Females showed between 1.4- and 1.9-fold higher levels of three proteins of the citric acid cycle: two isoforms of malate dehydrogenase (**MDH**) that converts oxaloacetate into malate and isocitrate dehydrogenase (**IDH**), that catalyses the oxidative decarboxylation of isocitrate, producing α -ketoglutarate and CO_2 while converting NAD^+ to $NADH$.

Six metabolic regulating proteins were overrepresented in castrated males. Two small heat shock proteins, HSP27 and α -b-crystallin which both increase in response to exercise and oxidative stress and prevent aggregation of denatured proteins (Neufer & Benjamin, 1996; Thompson et al., 2003), were strongly overrepresented in castrated males with 12- and 86-fold increases, respectively. DJ-1 protein, a redox-dependent chaperone (Shendelman, Jonason, Martinat, Leete, & Abeliovich, 2004) and 2 isoforms of GDI2 had about 30% higher levels in castrated males compared to females. Annexin A5, a partly pH and Ca^{2+} dependent phospholipid binding protein involved in intracellular membrane organisation (Gerke & Moss, 2002), showed a 7-fold increase in castrated males. CGI-29, PRDX6 and Esterase-D (or formylglutathion hydrolase, **FGH**), belonging to the formaldehyde detoxification pathway (Harms, Ras, Reynders, Van Spanning, & Stouthamer, 1996) had both 1.4-fold higher levels in females.

Three isoforms of muscle creatine kinase (**CKM**) had 1.4-fold higher levels in females, while a fragment, creatine kinase B chain had 1.8-fold higher levels in castrated males. CKM belongs to the phosphotransferase family and reversibly catalyses the transfer of phosphate between ATP and various phosphogens such as creatine phosphate. The lower compared to the theoretical molecular weight of at least two of the CKM isoforms suggest that the molecule has changed. This results probably from proteolytic, or, given the early *post-mortem* sampling time, oxidative processes (Sayd et al., 2006).

Twelve proteins involved in muscular contraction were overrepresented in castrated male pigs. Some of these proteins were constituents of the contractile apparatus: three isoforms of the myosin light chain 2 (**MLC2**), two isoforms of actin, two isoforms of tropomyosin, and fast troponin T. At the ionic strength used in the present study, the actomyosin complex is only slightly soluble and the extracted myofibrillar molecules are very probably constituents of non-complexed actin and myosin molecules (Sayd et al., 2006). Three proteins were calcium binding proteins (**CBP**) implicated in the regulation of intracellular calcium content.

Gender differences were further found for blood iron binding proteins. Transferrin, which binds free iron to deliver it to the cells and the $\alpha 15$ chain of haptoglobin, expressed by the liver and secreted in plasma and combining with free plasma haemoglobin released by erythrocytes, had a 2-fold higher expression in female pigs.

Four out of seventeen proteins classified as miscellaneous were overrepresented in castrated males. The cytochrome Bc1 complex (**cyt Bc1**) involved in mitochondrial electron transport during oxidative phosphorylation of ADP into ATP showed 13-fold higher lev-

Table 3
Identifications of proteins showing different levels according to rearing conditions

Spot no.	Protein name ^a	Accession no. ^a	Organism	Location	Mascot score ^b	% cov ^c	MP ^d	Theoretical MW/pI ^e	Observed MW/pI ^e	Spot quantity ^f		p ^g
										Indoor	Outdoor	
<i>Glycolytic pathway</i>												
4207	β-Enolase 3	XP_536606	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	123	43	15	47.1/8.05	43.0/6.45	3410.1	2348.4	**
7103	Phosphoglycerate mutase 1	NP_059024	<i>Rattus norvegicus</i>	Cytoplasm	154	75	18	33.0/8.85	33.0/7.30	1235.0	978.4	*
4001	Triosephosphate isomerase	NP_001013607	<i>Bos taurus</i>	Cytoplasm	109	54	11	26.7/6.45	31.0/6.40	1004.8	627.1	*
<i>Oxygen binding</i>												
6004	Chain B, Myoglobin	1M1NB	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	86	54	8	16.9/6.83	15.5/7.20	186.5	323.8	*
6017	Chain B, Myoglobin	1M1NB	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	126	74	11	16.9/6.83	15.5/7.10	164.1	312.2	*
<i>Chaperone and regulation</i>												
5020	α-b-Crystallin	7441290	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	92	41	7	20.1/6.76	23.5/7.10	38.4	93.3	*
5104	CGI-29 protein	AAH17594	<i>Homo sapiens</i>	Cytoplasm	88	45	15	27.2/6.45	35.0/6.75	374.0	494.3	*
3422	Chain D, aldehyde dehydrogenase	1AG8D	<i>Bos taurus</i>	Mitochondria	121	34	14	54.4/6.45	55.0/6.25	5811.1	4380.9	**
3303	Guanosine diphosphate dissociation inhibitor 2	NP_001001643	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	206	53	25	50.2/6.31	49.0/5.95	225.4	286.8	*
2516	Heat shock protein 72 kDa	AAR30953	<i>sus scrofa</i>	Cytoplasm	178	54	27	72.0/5.60	68.0/5.90	5695.0	8348.1	**
4101	Peroxiredoxin 6	NP_999573	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	161	83	18	25.0/5.73	32.0/6.30	1122.6	734.1	***
<i>Myofibrillar and cytoskeleton structure</i>												
1336	Chain A, Structural basis of actin	1T44A	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	191	48	17	41.2/5.55	47.0/5.45	15171.5	29788.0	*
8015	Cofilin 2	XP_586471	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	103	65	11	18.7/7.66	19.0/8.00	420.3	1018.7	**
<i>Miscellaneous</i>												
5227	Cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	AAB58703	<i>Susscrofa</i>	Cytoplasm	89	54	9	19.9/5.03	41.0/6.70	84914.6	75673.2	*
1107	Pyridoxal phosphatase	XP_689525	<i>Homo sapiens</i>	Cytoplasm	72	23	10	34.5/5.21	39.0/5.50	453.6	375.3	*
<i>Unidentified</i>												
1021	Unidentified protein									83.6	119.3	*
2002	Unidentified protein									571.5	1121.3	**
2005	Unidentified protein									291.3	844.6	**
4003	Unidentified protein									645.0	1106.2	*
4015	Unidentified protein									435.6	267.5	*
4113	Unidentified protein									267.4	100.1	*
4117	Unidentified protein									192.9	143.4	*

^a Protein names and accession numbers were derived from the NCBI database.

^b Mascot scores greater than or equal to 68 are significant ($p < 0.05$).

^c Percentage of coverage of the entire amino acid sequence.

^d Number of matched peptides.

^e MW and pI: theoretical (recorded in NCBI database) and observed (calculated from the spot position on the gel).

^f Spot quantity: average quantity in treatment groups. Higher values are in bold type.

^g p-Values derived from the analysis of variance $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Table 4
Identification of proteins showing different levels according to breed of sire

Spot no.	Protein name ^a	Accession no. ^a	Organism	Location	Mascot score ^b	% cov ^c	MP ^d	Theoretical MW/pi ^e	Observed MW/pi ^e	Spot quantity ^f		p ^g
										Duroc	Large White	
<i>Glycolytic pathway</i>												
5313	β -Enolase 3	ABC75829	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	110	43	20	47.1/8.05	47.5/6.80	10667.8	14020.5	*
4418	Pyruvate kinase, isozyme M1	P11979	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	114	39	24	56.7/7.32	50.0/6.50	302.4	134.6	*
<i>Chaperone and regulation</i>												
3302	Aldehyde dehydrogenase 9	AAB06721	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	71	23	11	50.9/5.69	49.7/5.60	577.2	427.6	*
2615	Heat shock protein 73 kDa	AAR30953	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	150	44	22	73.0/5.60	69.0/5.75	2321.3	1423.4	*
<i>Myofibrillar structure</i>												
13	Parvalbumin alpha (muscle)	XP_581411	<i>Bos taurus</i>	Cytoplasm	73	36	8	11.9/4.98	13.0/4.80	6309.8	10186.7	*
<i>Miscellaneous</i>												
3202	Aminoacylase I	CAA48565	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	168	45	17	45.3/5.61	45.5/5.95	3008.1	2376.0	**
<i>Unidentified</i>												
2202	Unidentified protein									271.9	158.2	*
3011	Unidentified protein									822.4	566.2	*
3108	Unidentified protein									668.8	448.8	*
5516	Unidentified protein									1211.5	886.0	*

^a Protein names and accession numbers were derived from the NCBI database.

^b Mascot scores greater than or equal to 68 are significant ($p < 0.05$).

^c Percentage of coverage of the entire amino acid sequence.

^d Number of matched peptides.

^e MW and pi: theoretical (recorded in NCBI database) and observed (calculated from the spot position on the gel).

^f Spot quantity: average quantity in treatment groups. Higher values are in bold type.

^g p-Values derived from the analysis of variance. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Table 5
Identifications of proteins showing different levels according to gender

Spot no.	Protein name ^a	Accession no. ^a	Organism	Location	Mascoat score ^b	% cov ^c	MP ^d	Theoretical MW/pI ^e	Observed MW/pI ^e	Spot quantity ^f		p ^g
										Castrated male	Female	
<i>Glycolytic pathway</i>												
5202	3-Phosphoglycerate kinase	1VJDA	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	202	37	17	44.4/8.01	46.0/6.75	3781.6	7120.2	***
4209	β-Enolase 3	XP_536606	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	115	39	16	47.1/8.05	45.0/6.60	602.8	1019.2	**
4213	β-Enolase 3	XP_536606	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	126	39	16	47.1/8.05	44.0/6.65	395.6	572.7	**
4215	β-Enolase 3	CAI25172	<i>Mus musculus</i>	Cytoplasm	92	57	8	20.9/8.91	40.5/6.60	6022.6	8601.9	***
5215	β-Enolase 3	XP_536606	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	144	40	14	47.1/8.05	44.0/6.65	891.8	1272.2	***
5216	β-Enolase 3	AA860279	<i>Mus musculus</i>	Cytoplasm	96	58	9	20.9/8.91	42.5/6.85	10002.6	13156.5	**
5217	β-Enolase 3	XP_536606	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	101	39	10	47.1/8.05	44.0/6.65	666.4	490.5	**
5321	Enolase 1	BAD96237	<i>Homo sapiens</i>	Cytoplasm	171	39	10	47.1/7.01	50.0/6.75	1518.3	2186.6	**
5126	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	2623266	<i>Ovis aries</i>	Cytoplasm	69	17	5	29.8/8.28	37.5/6.80	166.6	296.6	**
6110	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	681085A	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	75	13	5	35.7/6.63	41.0/7.25	3171.6	6942.5	**
7019	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	AAC16089	<i>Felis catus</i>	Cytoplasm	56	19	7	19.7/6.65	25.3/7.40	219.7	327.6	**
6518	Phosphoglycerate mutase-1	P00949	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Cytoplasm	102	21	10	61.4/6.62	62.0/7.25	54966.4	68368.7	**
5414	Pyruvate kinase isozyme M1	1PKM	<i>Felis catus</i>	Cytoplasm	113	22	13	56.8/7.32	50.0/6.75	397.5	600.8	**
6116	Triosephosphate isomerase	NP_001013607	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	107	44	10	26.7/6.45	32.5/6.95	164.3	279.1	**
6125	Triosephosphate isomerase	NP_001013607	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	155	49	11	26.7/6.45	30.0/7.10	55896.9	65997.0	**
<i>Citric acid cycle</i>												
4204	Isocitrate dehydrogenase alpha chain	BAC33199	<i>Mus musculus</i>	Mitochondria	105	33	13	39.6/6.27	43.0/6.30	403.6	767.6	**
3518	Malate dehydrogenase	CAA63599	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	133	30	17	62.0/5.44	63.0/6.20	958.7	1717.7	**
4106	Malate dehydrogenase	AAA31072	<i>Sus scrofa</i>	Mitochondria	143	49	15	32.0/6.15	40.0/6.50	13175.0	18277.7	**
<i>Chaperone regulation and detoxification</i>												
5020	α-β-Crystallin	7441290	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	92	41	7	20.1/6.76	23.5/7.10	130.2	1.5	*
121	Annxin 5	AA824204	<i>Bos taurus</i>	Nuclear	182	61	18	35.9/4.94	36.0/5.00	302.80	43.2	***
5104	Cg1-29 protein	AAH17594	<i>Homo sapiens</i>	Cytoplasm	88	45	5	27.2/6.45	35.0/6.75	359.9	508.5	**
2004	DJ1 protein	NP001072131	<i>Homo sapiens</i>	Cytoplasm	70	5	19.9/6.33	27.5/5.75	206.7	168.4	***	
6107	Esterase D	NP_999225	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	208	62	16	31.5/6.54	36.0/7.25	3164.3	4463.2	**
3303	Guanosine diphosphate dissociation inhibitor 2	NP_001001643	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	206	53	25	50.2/6.31	49.0/5.95	288.7	223.5	*
3308	Guanosine diphosphate dissociation inhibitor 2	NP_001001643	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	234	56	28	50.2/6.31	49.0/5.95	692.6	454.9	*
3114	Heat shock 27 kDa protein 1	AAX46397	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	96	35	7	22.9/7.57	30.0/6.20	3818.2	324.0	*
4101	Peroxiredoxin 6	NP999573	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	161	83	18	25.0/5.73	32.0/6.30	677.3	1179.4	*
<i>Myofibrillar and cytoskeleton structure</i>												
11	Ca ²⁺ -binding protein-like protein	AAX77006	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	80	52	8	16.6/4.63	12.0/4.80	5717.1	355.7	***
12	Ca ²⁺ -binding protein-like protein	AAX77006	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	80	52	8	16.6/4.63	12.0/4.80	4684.8	2471.9	***
38	Ca ²⁺ -binding protein-like protein	CAA77006	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	80	52	8	16.6/4.63	12.0/4.80	15070.4	8043.5	***
34	Cardiac ventricular myosin light chain 2	CAA46931	<i>Homo sapiens</i>	Cytoplasm	81	59	7	18.8/4.92	21.0/4.90	140.9	1.5	*
1335	Chain A. Structural basis of actin	1T44A	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	191	48	17	41.2/5.55	47.0/5.45	2877.0	478.1	***
1336	Chain A. Structural basis of actin	1T44A	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	191	48	17	41.2/5.55	47.0/5.45	37194.0	7765.5	***
3004	Cofilin 2	AAW66489	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	82	57	7	18.7/7.66	20.0/6.10	234.3	64.4	***
31	Myosin regulatory light chain 2	NP_001006592	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	121	64	10	19.0/4.90	18.0/4.90	6770.5	477.7	***
1006	Myosin regulatory light chain 2	NP_001006592	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	151	80	13	19.0/4.90	18.0/5.20	816.7	353.9	**
110	Tropomyosin 1 alpha	AA02910	<i>Bos taurus</i>	Cytoplasm	192	47	19	32.7/4.69	38.0/4.80	12670.6	2146.4	**
105	Tropomyosin 2 beta	NP_033442	<i>Mus musculus</i>	Cytoplasm	104	34	13	32.8/4.66	40.0/4.80	5736.7	580.6	***
6208	Troponin T fast skeletal muscle type	BAD15377	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	129	41	17	32.1/6.00	42.5/7.20	2303.4	523.8	*
<i>Phosphotransferase</i>												
2308	Creatine kinase B-type	P05124	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	160	49	18	42.7/5.47	47.0/5.80	336.3	183.4	*
6106	Muscular creatine kinase	AAZ66747	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	84	25	12	43.3/6.61	32.5/7.25	905.3	1290.8	*
7107	Muscular creatine kinase	AAZ66747	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	88	28	12	43.0/6.61	32.5/7.40	348.5	495.7	*
7220	Muscular creatine kinase	AAZ66748	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	170	38	16	43.0/6.61	39.0/7.40	1324.5	1880.5	**
<i>Iron binding</i>												
6122	Haptoglobin alpha 15	AA823858	<i>Sus scrofa</i>	Secreted	37	42	31	9.3/5.27	32.5/7.30	226.3	481.3	**
5613	Transferrin	CAA30943	<i>Sus scrofa</i>	Membrane	244	42	31	76.9/6.73	71.0/7.00	1644.7	3489.0	***
<i>Miscellaneous</i>												
7006	Adenylate kinase isoenzyme 1	P00570	<i>Bos taurus</i>	Cytoplasm	Profound	21	14	21.6/8.94	26.0/7.45	313.1	208.5	*
4618	Albumin	CAA30970	<i>Sus scrofa</i>	Secreted	80	45	22	69.4/5.92	66.0/6.30	181.5	361.2	***
011	Antiquitin	AAH02515	<i>Homo sapiens</i>	Cytoplasm	176	44	9	58.7/8.00	55.0/6.55	797.4	1159.4	*
6003	Biliverdin reductase B	XP_214823	<i>Rattus norvegicus</i>	Cytoplasm	86	44	9	22.1/6.29	28.0/7.15	405.0	526.5	*
4102	Bisphosphoglycerate mutase	XP_519396	<i>Pan troglodytes</i>	Cytoplasm	131	43	14	30.0/6.1	32.0/6.40	1846.0	2539.0	*
4205	Cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	AA858703	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	100	49	10	19.9/5.03	41.0/6.35	3751.8	5125.6	*
5203	Dimeric dihydriodiol dehydrogenase	NP_999331	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	189	43	17	36.5/6.34	43.0/6.75	781.8	1044.4	**

2209	Four and a half LIM domains 3	AAR27433	<i>Sus scrofa</i>	43	10	27.7/5.78	41.0/5.80	263.6	230.9
5614	GARS protein	AAH00065	<i>Homo sapiens</i>	23	18	84.6/7.85	70.0/6.70	487.6	1019.7
4410	Leucine aminopeptidase	1LCPB	<i>Bos taurus</i>	35	17	52.6/5.77	55.0/6.50	1382.6	2123.7
2302	Mitochondrial cytochrome bc1 complex	1OCRA	<i>Bos taurus</i>	100		49.2/5.46	50.0/5.60	648.7	47.4
5124	Proteasome endopeptidase complex chain C2	JX0228	<i>Rattus norvegicus</i>	90	13	29.5/6.15	34.5/6.75	1049.1	1648.7
5002	Proteasome subunit, Beta type, 2	AAP35801	<i>Homo sapiens</i>	135	10	22.8/6.51	26.5/6.75	572.6	911.9
7017	Raf Kinase inhibitor protein	1A44	<i>Bos taurus</i>	38	6	20.7/6.62	24.0/7.45	138.2	28309.0
4305	S-Adenosylhomocysteine hydrolase/LAP	BAD99576	<i>Sus scrofa</i>	51	23	47.7/5.88	47.0/6.40	222.2	387.6
4306	S-Adenosylhomocysteine hydrolase/LAP	BAD99576	<i>Sus scrofa</i>	51	23	47.7/5.88	47.0/6.40	536.9	772.0
5401	Tripartite motif protein 50, Partial	XP_607236	<i>Homo sapiens</i>	51	23	27.0/6.43	55.0/6.65	840.2	339.2
Unidentified									
46	Unidentified protein							1770.1	95.7
1022	Unidentified protein							922.5	4.5
1115	Unidentified protein							145.3	10.4
1207	Unidentified protein							315.3	191.7
1426	Unidentified protein							237.2	50.6
2002	Unidentified protein							1584.3	108.5
2005	Unidentified protein							919.3	216.7
2202	Unidentified protein							202.3	227.8
2309	Unidentified protein							136.9	209.2
3014	Unidentified protein							153.7	47.6
3103	Unidentified protein							434.2	546.5
4003	Unidentified protein							1384.1	367.1
4013	Unidentified protein							15209.3	20545.4
4107	Unidentified protein							5843.8	8611.5
4108	Unidentified protein							3744.0	6087.0
4113	Unidentified protein							76.6	290.8
4114	Unidentified protein							99.2	220.9
5324	Unidentified protein							71.8	86.4
5404	Unidentified protein							211.0	293.6
6007	Unidentified protein							198.7	1.5
6016	Unidentified protein							2168.4	4295.0
6114	Unidentified protein							648.3	1081.2
6121	Unidentified protein							128.2	218.4
7125	Unidentified protein							94.38	1461.7
8002	Unidentified protein							12706.4	679.8
8027	Unidentified protein							247.5	126.9

^a Protein names and accession numbers were derived from the NCBI database.

^b Mascot scores greater than or equal to 68 are significant ($p < 0.05$).

^c Percentage of coverage of the entire amino acid sequence.

^d Number of matched peptides.

^e MW and pI: theoretical (recorded in NCBI database) and observed (calculated from the spot position on the gel).

^f Spot quantity: average quantity in treatment groups. Higher values are in bold type.

^g p -values derived from the analysis of variance. $p < 0.05$, ^{*} $p < 0.01$, ^{**} $p < 0.001$.

Table 6

Pearson correlation (r), p -values and effect of gender (p -values) on the proteins correlated with Bradford values, after introduction of Bradford values in the analysis of variance

	r	p	Gender effect (p)
<i>Positive</i>			
MLC (spot 34)	0.77	<0.0001	0.57
MLC (spot 1006)	0.69	0.002	0.07
HSP27	0.80	<0.0001	0.53
α -b-Crystallin	0.72	<0.0001	0.61
Tripartite domain protein	0.66	0.0005	0.32
<i>Negative</i>			
ENO3P(spot 4215)	-0.67	0.0004	0.93
ENO3P(spot 5216)	-0.8	<0.0001	0.34
Leucine aminopeptidase	-0.56	0.004	0.48
CKM	-0.75	<0.0001	0.94

els in castrated males. Other proteins involve two zinc-binding proteins, the four and a half LIM domains 3 and tripartite motif protein 50, and adenylate kinase isoenzyme 1, catalysing the conversion of ADP from ATP and AMP in the cytoplasm. Bisphosphoglycerate mutase acting as an allosteric inhibitor of hemoglobin in erythrocytes, two subunits of the proteasome, characterised by its ATP-dependent ability to cleave peptides, two isoforms of S-adenosylhomocysteine hydrolase (**S-AHH**), involved in the methionine cycle, Raf kinase inhibitor protein (**RKIP**), involved in several cell signalling cascades (Hagan, Garcia, Dhillon, & Kolch, 2006; Keller, Fu, & Brennan, 2004), Leucine aminopeptidase involved in the degradation of proteins (Joseph & Sanders, 1966) and cG3PDH showed a higher levels in females. Antiquitin (aldehyde dehydrogenase 7 family, member A1), playing a role in detoxification of aldehydes generated by carbohydrate metabolism and lipid peroxidation, GARS protein (glycyl tRNA synthetase) involved in protein synthesis are further examples of proteins overrepresented in females. Twenty-six proteins remained unidentified.

The Bradford assay showed higher levels of extracted protein ($p < 0.005$) in muscle extractions from castrated males compared to females (120.7 ± 11.1 vs 107.7 ± 7.6 μ g/300 mg of fresh muscle). No differences were found between breed of sire ($p = 0.51$) or rearing environment ($p = 0.46$). Five and four proteins were positively and negatively correlated, respectively, with overall extractability of proteins. Inclusion of values of the Bradford assay as a covariable in the analysis of variance removed the effect of gender on these proteins (Table 6). Inclusion of any of these proteins, except for ENO3 β (spot 4215), leucine aminopeptidase and CKM, as covariable in the analysis of variance of Bradford protein levels removed the effect of gender on extractability.

Gender effects on protein content were sometimes related to variations in glycolytic potential or ultimate pH. Thus, introduction of glycolytic potential as covariate ($p < 0.05$) into the analysis of variance removed the gender effect ($p > 0.49$) on PGK, selenium binding protein 1, and 3 unidentified proteins (spots 1022, 1426, 7125). In contrast, glycolytic potential was negatively correlated ($p < 0.03$) with CKM levels, but did not remove the gender effect ($p = 0.003$). Similarly, introduction of ultimate pH as covariate ($p < 0.05$) removed the gender effect ($p > 0.10$) on cardiac ventricular MLC2, selenium binding protein 1, and an unidentified protein (spot 1022). Ultimate pH was correlated ($p < 0.05$) with another spot (1115) without removing the gender effect ($p = 0.01$).

3.6. Interactions of several treatment factors

Thirty-two proteins were influenced by interactions between treatment factors (Table 7). BIP protein is an endoplasmic reticulum residing chaperone that facilitates the assembly of multimeric protein complexes (Esfandiari, Villanueva, Wong, French, &

Halsted, 2005). Heat Shock Cognate-71 kDa (**HSC70**) is involved in the folding and assembly pathways of myosin (Srikakulam & Winkelmann, 2004). Four proteins were influenced by a rearing environment \times breed of sire interaction, and 13 and 17 by rearing environment \times gender and breed of sire \times gender interactions, respectively.

Inspection of interactions showed that breed of sire influenced abundance of all four proteins in indoor pigs, but none in outdoor pigs, and of three proteins in castrated males and 10 in females. Rearing environment influenced levels of two proteins in Duroc-sired and one in Large White-sired pigs, and of seven and five proteins in castrated males and females, respectively. Gender influenced levels of 10 proteins in Duroc-sired and 10 in Large White-sired pigs, and 12 and 3 proteins in outdoor and indoor pigs, respectively.

4. Discussion

The present study has determined proteins levels present in the cellular soluble fraction of the muscular cell containing most of the proteins involved in metabolism and signal transduction pathways. We found main effects of rearing environment, breed of sire and/or gender influencing relative amounts of 120 of the 220 matched muscle protein spots as well as pre-slaughter glycogen content, ultimate pH and water holding capacity. Nine proteins received more than one main effect. Overall 50.5% of the matched proteins were influenced by at least one main treatment effect. Some of the influenced proteins are not intact as indicated by reduced compared to the theoretical molecular weight. This is due to biochemical processes, related to proteolysis, or, given the early *post-mortem* sampling times, oxidation (Sayd et al., 2006).

Samples were obtained after slaughter, and different results could have been observed had they been obtained under resting conditions. The studied pigs of each of the treatment groups were selected to represent a relatively large range of pre-slaughter glycogen content and ultimate pH values. Analyses of covariance found that the large majority of the treatment effects on proteins were unrelated to these variations. Treatment effects appear, therefore, to be of a rather constitutive character.

The objective of the present part of the study was to determine which proteins are influenced by the different treatment factors, and to relate them to meat quality at a second stage (Kwasiborski et al., accepted for publication). Outdoor rearing appears to increase oxidative muscle metabolism as several glycolytic enzymes, TPI, ENO3 β and PGM1, were overrepresented in indoor, and two isoforms of myoglobin were overrepresented in outdoor pigs. These results were coherent with the earlier demonstration, that outdoor reared pigs had a higher percentage of IIA fibres and a lower percentage of IIB/X fibres in the *Longissimus dorsi* muscle (Gentry, Mc Glone, Miller, & Blanton, 2004). Increased levels of ALDH and PRDX6, both involved in clearance of metabolic side products, were related. Increased ALDH levels were further related to lower Mb levels. This suggests that increased ALDH and PRDX6 levels in indoor pigs are related to their less oxidative and more glycolytic oriented metabolism. At least part of this difference may be related to increased physical activity due to increased space allowance in outdoor pigs. Gondret, Combes, Lefaucheur, and Lebret (2005) demonstrated that in pigs and rabbits, physical activity increased levels of oxidative enzymes and proportion of slow contracting muscle fibres. This may also explain the higher HSP72 levels in outdoor pigs, as slow oxidative fibres appear to have higher HSP72 contents (Locke, Atkinson, Tanguay, & Noble, 1994). Outdoor rearing-induced increases in protein levels such as GDI2, CGI29, and an isoform of cofilin 2, possibly indicate increased protein turnover and contractile activity. Protein levels may also be influenced by

Table 7
Identifications of proteins showing different levels according to interactions between treatment factors

Spot no.	Protein name ^A	Accession no. ^A	Organism	Location	Mascot score ^B	% cov ^C	MP ^D	Theoretical MW/ pI ^E	Observed MW/ pI ^E	Spot quantity ^F				
										Outdoor		Indoor		
										Duroc	Large White	Duroc	Large White	
<i>Rearing environment × Breed of sire</i>														
Glycolytic pathway														
	5313	β-Enolase 3	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	110	43	20	47.1/8.05	47.0/6.80	12394.2 ^{ab}	12675.5 ^a	8941.4 ^b	15365.6 ^a	
Chaperone and regulator														
	613	BIP protein	<i>Homo sapiens</i>	Endoplasmic reticulum	165	45	26	70.9/5.23	71.0/5.1	323.4 ^b	402.7 ^{ab}	456.1 ^a	312.1 ^b	
	1610	Heat shock cognate 71 kDa	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	201	50	30	70.8/5.24	69.5/5.50	3440.1 ^{ab}	4218.5 ^a	4153.8 ^a	3059.0 ^b	
Myofibrillar structure														
	1015	Myosin light chain	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	72	47	10	22.4/5.20	28.0/5.20	474.3 ^c	934.9 ^{ab}	1308.6 ^a	544.2 ^o	
<i>Rearing environment × gender</i>														
Glycolytic pathway														
	2201	Glycerolaldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	74	37	11	35.7/8.52	41.0/5.60	346.0 ^b	560.3 ^a	379.0 ^b	326.2 ^b	
	6315	Pyruvate kinase, isozyme M1	<i>Felis catus</i>	Cytoplasm	140	45	27	56.8/7.32	52.0/7.30	249.8 ^a	106.4 ^b	106.8 ^b	140.6 ^{ab}	
Citric acid cycle														
	3518	Malate dehydrogenase	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	133	30	17	62.0/5.44	63.0/6.20	782.9 ^b	1979.8 ^a	1134.5 ^{ab}	1455.6 ^a	
Chaperone and regulation														
	3303	Guanosine diphosphate dissociation inhibitor 2	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	206	53	25	50.2/6.31	49.0/5.95	357.7 ^a	215.9 ^b	219.7 ^b	231.1 ^b	
	4101	Peroxiredoxin 6	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	161	83	18	25.0/5.73	32.0/6.30	583.0 ^c	885.2 ^b	771.6 ^{bc}	1473.6 ^a	
	5020	α-b-Crystallin	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	92	41	7	20.1/6.76	23.5/7.10	185.1 ^a	1.5 ^b	75.3 ^b	1.5 ^b	
Myofibrillar structure														
	1015	Myosin light chain	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	72	47	10	22.4/4.63	28.0/5.20	117.3 ^a	291.9 ^b	756.5 ^{ab}	1096.3 ^a	
Iron binding														
	3115	Myosin light chain 1	<i>Canis familiaris</i>	Cytoplasm	34	30	5	22.9/5.4	16.1/5.73	502.9 ^a	89.7 ^b	113.7 ^b	98.7 ^b	
	5608	Transferrin	<i>Sus scrofa</i>	Membrane	238	51	32	76.9/6.73	72.0/6.80	888.4 ^b	896.2 ^b	728.9 ^b	1384.8 ^a	
Unidentified														
	1022	Unidentified protein								1509.5 ^a	1.5 ^c	335.6 ^{ab}	7.5 ^{bc}	
	2005	Unidentified protein								1509.4 ^a	179.8 ^b	329.1 ^b	253.5 ^b	
	3206	Unidentified protein								194.3 ^a	102.2 ^b	90.6 ^b	108.1 ^b	
	4309	Unidentified protein								221.2 ^a	104.0 ^b	94.7 ^b	218.2 ^a	
<i>Breed of sire × gender</i>														
Chaperone and regulation														
	121	Annexin 5	<i>Bos taurus</i>	Nuclear	182	61	18	35.9/4.94	36.0/5.00	260.5 ^a	84.9 ^{ab}	345.2 ^a	1.44 ^b	
	4526	Albumin	<i>Sus scrofa</i>	secreted	80	21	14	69.4/5.92	66.0/6.30	65901.9 ^b	94157.4 ^a	84677.4 ^{ab}	70678.2 ^b	
Myofibrillar structure														
	105	Tropomyosine 2 beta	<i>Mus musculus</i>	Cytoplasm	104	34	13	32.8/4.66	40.0/4.80	5474.9 ^a	868.5 ^b	5998.5 ^a	292.7 ^c	
	110	Tropomyosin 1 alpha	<i>Bos taurus</i>	Cytoplasm	192	47	19	32.7/4.69	38.0/4.80	10252.7 ^{ab}	3351.4 ^{bc}	15088.4 ^a	941.3 ^c	
	1006	Myosin regulatory light chain 2	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	151	80	13	19.0/4.90	18.0/5.20	688.0 ^{ab}	497.8 ^{ab}	945.5 ^a	210.0 ^b	
	1335	Chain A. Structural basis of actin	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	191	48	17	41.2/5.55	47.0/5.45	2335.8 ^a	3418.1 ^a	265.4 ^c	265.4 ^c	
	8015	Cofilin 2	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	103	65	11	18.7/7.66	19.0/8.00	740.2 ^{ab}	1033.0 ^a	712.6 ^{ab}	392.4 ^b	

(continued on next page)

Table 7 (continued)

Spot no.	Protein name ^A	Accession no. ^A	Organism	Location	Mascot score ^B	% cov ^C	MP ^D	Theoretical MW/pi ^E		Observed MW/pi ^E		Spot quantity ^F	
								Female	Male	Female	Male	Duroc	Large White
	Phospho-ansiferase												
7220	Muscular creatine kinase	AAZ66748	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	170	38	16	43.0/6.61	39.0/7.40	1507.1 ^b	1498.2 ^b	1141.8 ^b	2262.8 ^a
	Iron binding												
2209	Four and a half LIM domains 3	AAR27433	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	104	43	10	27.7/5.78	41.0/5.80	202.1 ^{bc}	345.3 ^a	325.0 ^{ab}	1116.6 ^c
5608	Transferrin	CAA30943	<i>Sus scrofa</i>	Mitochondria	238	51	32	76.9/6.73	72.0/6.80	580.5 ^c	1413.6 ^a	1036.7 ^b	867.4 ^{bc}
	Oxygenbinding												
7005	Chain B, Myoglobin	1MYIB	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	175	78	12	16.9/6.54	16.0/7.40	10792.4 ^a	9557.8 ^{ab}	7839.5 ^b	10672.5 ^a
	Indicator of proteolysis												
4408	Leucine aminopeptidase	1LCPB	<i>Bos taurus</i>	Cytoplasm	71	28	14	52.6/5.77	55.0/6.40	992.5 ^a	335.8 ^b	583.3 ^{ab}	684.2 ^{ab}
	Miscellaneous												
3018	Fatty acid binding protein 3	AA172764	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	58	56	7	13.2/6.95	16.1/5.73	24.2 ^b	59.2 ^a	42.8 ^a	24.3 ^b
3202	Aminoacylase 1	CAA48565	<i>Sus scrofa</i>	Cytoplasm	168	45	17	45.3/5.61	45.5/5.95	2647.3 ^b	3368.8 ^a	2540.6 ^b	2211.4 ^b
6617	WD repeat domain protein 1	CAH92333	<i>Pongo pygmaeus</i>	Cytoplasm	163	37	19	66.2/6.17	66.0/7.10	124.8 ^b	324.0 ^a	263.9 ^{ab}	124.0 ^b
	Unidentified												
4109	Unidentified protein									12388.5 ^b	24594.0 ^a	19305.9 ^{ab}	20771.1 ^{ab}
6016	Unidentified protein									3690.8 ^{ab}	2397.8 ^{ab}	645.8 ^b	6192.1 ^a

abc – A different letter represents an expression significantly different of the group.

A Protein names and accession numbers were derived from the NCBI database.

B Mascot scores greater than or equal to 68 are significant ($p < 0.05$).

C Percentage of coverage of the entire amino acid sequence.

D Number of matched peptides.

E MW and pi: theoretical (recorded in NCBI database) and observed (calculated from the spot position on the gel).

F Spot quantity: average quantity in treatment groups. Higher values are in bold type.

differences in feeding levels between indoor and outdoor pigs (Lametsch et al., 2006) or be due to systemic changes, for example, related to altered organ functioning. Outdoor pigs were exposed to larger temperature fluctuations and better air quality and had healthier lung condition (un-shown data obtained at slaughter). Muscle vascularity and cardiac function may also have been different.

Breed of sire influenced to a much lesser extent proteins. Most of them are involved in the carbohydrate metabolic pathway. While ENO3 β was overrepresented in Large White sired pigs, PKM1 was overrepresented in Duroc-sired pigs, suggesting a slightly altered balance in the penultimate and last step of the glycolytic pathway. This similarity is consistent with an earlier demonstration that the *Longissimus* muscle of Large White and Duroc pigs of the same breeding company show few differences in fibre type composition (Chang et al., 2003).

The large influence of gender on protein levels illustrates the profound influences of circulating sex hormones. Fourteen of the fifteen proteins of the glycolytic pathway influenced by gender were overrepresented in female pigs, as well as two proteins of the citric acid cycle. The effect of sex hormones on metabolism and substrate use is well known in many species (Braun, Gerson, Hagobian, Grow, & Chipkin, 2005) and the higher amounts of enzymes of the glycolytic and citric acid cycle in our female pigs may indicate that they have lower fat reserves and a more glyco-gen-based metabolism than castrated males. Male and female sexual hormones, testosterone and estradiol, respectively, increase lipid availability and in pigs, castrated males have more intramuscular fat than entire males and females (Friesen, Nelssen, Unruh, Goodband, & Tokach, 1994; Jaturasitha, Kamopas, Suppadit, Khia-osa-ard, & Kreuzer, 2006; Lafontan & Berlan, 1995). Underlying mechanisms are complex and only partly known. For example, estradiol increases maximal activity of key enzymes in the fat oxidative pathway of skeletal muscle (Campbell & Febbraio, 2001) and castration decreases α 2-receptor-induced lipolysis (Lafontan & Berlan, 1995). Higher levels of the cytochrome Bc1 complex, observed in the castrated males, is coherent with a more lipid oriented metabolism. The glucose-based metabolism produces only acetyl-CoA. In contrast, β -oxidation of lipids produces both acetyl-CoA and electrons. Both products enter the respiratory chain, acetyl-CoA via complex I and electrons via the cytochrome Bc1 complex.

Castrated males exhibited much higher levels of most proteins related to the contractile apparatus and cytoskeleton. The higher levels of myofibrillar proteins, such as MLC2 and actin, possibly reflect an increase in extractability of these proteins in the *post-mortem* muscle of castrated males. Actin and myosin may form an actomyosin complex with strongly-binding cross-bridges (Bremel & Weber, 1972). At the ionic strength used in the present study, the actomyosin complex is poorly soluble and therefore less easily extracted than non-complexed actin and myosin molecules (Sayd et al., 2006). The extracted actin and myosin probably reflect inversely the amount of actomyosin existing at the time of sampling, indicating that less actomyosin was formed in samples of castrated males. The formation of actomyosin depends on intracellular Ca²⁺ levels (Gordon, Homsher, & Regnier, 2000), suggesting that *post-mortem*, castrated males possibly had lower intracellular Ca²⁺ levels. The presence of estradiol and testosterone increases intracellular Ca²⁺ levels (Estrada, Varshney, & Ehrlich, 2006; Rubio-Gayosso et al., 2000), and the relative absence of testosterone in castrated males would explain such lower levels. These gender differences may have existed *ante-mortem* and be related to, or exacerbated by, stress induced by the slaughter situation. Another, well-known example of an altered intracellular Ca²⁺ regulation, particularly under stressful conditions, is the one of the halothane gene (Cheah & Cheah, 1981). Alternatively, or in addition, lower

levels of ATP in castrated males may explain lower actomyosin levels (Gordon et al., 2000).

The higher levels of extracted MLC2 in castrated male pigs explain at least partly their increased Bradford values. This is indicated by the positive correlation between MLC2 levels and Bradford values, and by the fact that introduction of MLC2 as covariable into the analysis of variance removes the gender effect on Bradford values. The higher Bradford values at lower ENO3 β and CKM levels is in line with this hypothesis. Lower ENO3 β levels suggesting lower glycolytic activity, is likely to be related to lower Ca²⁺ and/or ATP levels, and, therefore, decreased formation of actomyosin, resulting in higher Bradford values. Increased extractability of MLC2 probably explains the higher levels of HSP27 and α -b-crystallin, which associate with actin, especially at the level of the Z- or I-bands (Sugiyama et al., 2000). As these small HSPs appear to be associated with myofibrillar proteins, extraction of the latter may facilitate extraction of the former. Similarly, total MLC2 levels were significantly positively correlated with total levels of cofilin 2 (data not shown), involved in the polymerisation of actin.

Alternatively, increased extraction levels of myofibrillar proteins may express increased myofibrillar content in castrated males. However, variations in myofibril content per cell are unlikely to explain gender effects on extraction levels as fold-changes between individuals are generally lower than 2 (Richter & Kellner, 1963). In summary, we hypothesise that, possibly due to the absence of testosterone, castrated males had lower intracellular calcium levels than intact females, at least *post-mortem*. These lower values resulted in a lower *post-mortem* metabolic rate, expressed in lower ENO3 β and CKM levels, and, as actomyosin formation is reduced, increased extractability of MLC2 and associated proteins, HSP27 and α -b-crystallin. Gender effects on the other proteins seem to be unrelated to differences in extractability, as no correlations with Bradford values were found.

In conclusion, the present study determined main effects of genetic background, rearing environment and/or gender influencing 50.5% of the matched cytoplasmic and mitochondrial protein spots in pigs, gender showing the largest effect. Differences in extractability did not explain the gender effects. Many influenced proteins were enzymes involved in energy or protein metabolism, or related to the contractile apparatus and may therefore influence meat quality. We report in a separate paper relationships between proteins and meat quality and their variations according to treatment group (Kwasiborski et al., accepted for publication). Results of this study help to understand better biochemical mechanisms that underlie phenotypic or genetic differences between animals, or their meat products. Proteomic studies may further help to identify protein markers related to, or predicting meat quality traits, as was shown by Morzel, Terlouw, Chambon, Micol, and Picard (2008). Such knowledge helps to under-build genetic choices for breeding purposes or in genetic selection.

Acknowledgements

The present study was financed by INRA (France) and Genus Plc (USA). The authors thank Elisabeth Laville for helpful comments.

References

- Bee, G., Guex, G., & Herzog, W. (2004). Free range rearing of pigs during the winter: Adaptation in muscle fiber characteristics and effects on adipose tissue composition and meat quality traits. *Journal of Animal Science*, 82, 1206–1218.
- Bendall, J. R. (1973). Post mortem changes in muscle. In G. H. Bourne (Ed.), *Structure and function of muscle* (2nd ed., pp. 244–309). New York, NY: Academic Press.
- Bergmeyer, H. U. (1974). Methods of enzymatic analysis. *Verlag Chemie Weinheim*, 2196(3), 1196–1201.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Braun, B., Gerson, L., Hagobian, T., Grow, D., & Chipkin, S. R. (2005). No effect of short-term testosterone manipulation on exercise substrate metabolism in men. *Journal of Applied Physiology*, 99, 1930–1937.
- Bremel, R. D., & Weber, A. (1972). Cooperation within actin filament in vertebrate skeletal muscle. *Nature – New Biology*, 238(82), 97–101.
- Campbell, S. E., & Febbraio, M. A. (2001). Effect of ovarian hormones on mitochondrial enzyme activity in the fat oxidation pathway of skeletal muscle. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism*, 281, 803–808.
- Chang, K. C., Da Costa, N., Blackley, R., Southwood, O., Evans, G., Plastow, G., et al. (2003). Relationships of myosin heavy chain fibre types to meat quality traits in traditional and modern pigs. *Meat Science*, 64, 93–103.
- Cheah, K. S., & Cheah, A. M. (1981). Mitochondrial calcium transport and calcium-activated phospholipase in porcine malignant hyperthermia. *Biochimica et Biophysica Acta*, 634, 70–84.
- Cho, D. H., Hong, Y. M., Lee, H. J., Woo, H. N., Pyo, J. O., Mak, T. W., et al. (2004). Induced inhibition of ischemic/hypoxic injury by APIP, a novel Apaf-1-interacting protein. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 39942–39950.
- Enfält, A. C., Lundstrom, K., Hansson, I., Lundeheim, N., & Nystrom, P. E. (1997). Effects of outdoor rearing and sire breed (Duroc or Yorkshire) on carcass composition and sensory and technological meat quality. *Meat Science*, 45, 1–15.
- Esfandiari, F., Villanueva, J. A., Wong, D. H., French, S. W., & Halsted, C. H. (2005). Chronic ethanol feeding and folate deficiency activate hepatic endoplasmic reticulum stress pathway in micropigs. *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology*, 289, 54–63.
- Estrada, M., Varshney, A., & Ehrlich, B. E. (2006). Elevated testosterone induces apoptosis in neuronal cells. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 25492–25501.
- Friesen, K. G., Nelssen, J. L., Unruh, J. A., Goodband, R. D., & Tokach, M. D. (1994). Effects of the interrelationship between genotype, sex and dietary lysine on growth performance and carcass composition in finishing pigs fed to either 104 or 127 kg. *Journal of Animal Science*, 72, 946–954.
- Gentry, J.-G., Mc Glone, J.-J., Miller, M.-F., & Blanton, J.-R. (2004). Environmental effects on pigs performance, meat quality and muscle characteristics. *Journal of Animal Science*, 82, 209–217.
- Gerke, V., & Moss, S. E. (2002). Annexins: From structure to function. *Physiological Reviews*, 82, 331–371.
- Gondret, F., Combes, S., Lefaucheur, L., & Lebret, B. (2005). Effects of exercise during growth and alternative rearing systems on muscle fibers and collagen properties. *Reproduction Nutrition Development*, 45, 69–86.
- González, B., Hernandez, R., & Manso, R. (2000). Stress proteins of 70 kDa in chronically exercised skeletal muscle. *European Journal of Physiology*, 440, 42–49.
- Gordon, A. M., Homsher, E., & Regnier, M. (2000). Regulation of contraction in striated muscle. *Physiological Reviews*, 80(2), 853–924.
- Gurkan, C., Lapp, H., Alory, C., Su, A. I., Hogenesch, J. B., & Balch, W. E. (2005). Large-scale profiling of Rab GTPase trafficking networks: The membrane. *Molecular Biology of the Cell*, 16, 3847–3864.
- Hagan, S., Garcia, R., Dhillon, A., & Kolch, W. (2006). Raf kinase inhibitor protein regulation of Raf and MAPK signaling. In W. E. Balch, C. J. Der, & A. Hall (Eds.), *Methods in Enzymology: Regulators and Effectors of Small GTPases: Ras Family* (pp. 248–259). Academic Press.
- Hamelin, M., Sayd, T., Chambon, C., Bouix, J., Bibé, B., Milenkovic, D., et al. (2006). Proteomic analysis of ovine muscle hypertrophy. *Journal of Animal Science*, 84, 3266–3276.
- Harms, N., Ras, J., Reynders, W. N. M., Van Spanning, R. J. M., & Stouthamer, A. H. (1996). S-formylglutathione hydrolase of *Paracoccus denitrificans* is homologous to human esterase D: A universal pathway for formaldehyde detoxification. *Journal of Bacteriology*, 178, 6296–6299.
- Honikel, K. O. (1998). Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Science*, 49, 447–457.
- Hwang, I. H., Park, B. Y., Cho, S. H., Kim, J. H., Choi, Y. S., & Lee, J. M. (2004). Identification of muscle proteins related to objective meat quality in Korean native black pig. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 17(11), 1599–1607.
- Jang, Y. M., Kim, D. W., Kang, T.-C., Won, M. H., Baek, N.-I., Moon, B. J., et al. (2003). Human pyridoxal phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 278(50), 50040–50046.
- Jaturasitha, S., Kamopas, S., Suppadit, T., Khiaosa-ard, R., & Kreuzer, M. (2006). The effect of gender of finishing pigs slaughtered at 110 kg on performance and carcass and meat quality. *Science Asia*, 32, 297–305.
- Joseph, R. L., & Sanders, W. J. (1966). Leucine aminopeptidase in extracts of swine muscle. *Biochemical Journal*, 100, 827–832.
- Keller, E. T., Fu, Z., & Brennan, M. (2004). The role of Raf kinase inhibitor protein (RKIP) in health and disease: Proceedings from the 6th and 7th international conferences, Signal Transduction 2004 and Chromatin 2004. *Biochemical Pharmacology*, 68, 1049–1053.
- Kwasiborski, A., Sayd, T., Chambon, C., Santé-Lhoutellier, V., Rocha, D., & Terlouw, C. (accepted for publication). Muscle proteome in pig: Part II. Relationships between protein quantity and meat quality. *Meat Science*.
- Lafontan, M., & Berlan, M. (1995). Fat cell α_2 -adrenoreceptors: The regulation of fat cell function and lipolysis. *Endocrine Reviews*, 16, 716–738.
- Lametsch, R., Kristensen, L., Larsen, M. R., Therkildsen, M., Oksbjerg, N., & Ertbjerg, P. (2006). Changes in the muscle proteome after compensatory growth in pigs. *Journal of Animal Science*, 84, 918–924.
- Laville, E., Sayd, T., Terlouw, C., Chambon, C., Damon, M., Larzul, C., et al. (2007). Comparison of sarcoplasmic proteomes between two groups of pig muscles

- selected for shear force of cooked meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5834–5841.
- Lehman, W., Craig, R., & Vibert, P. (1994). Ca²⁺-induced tropomyosin movement in limulus thin filaments revealed by three-dimensional reconstruction. *Nature*, 368, 65–67.
- Liaw, S. H., Chen, S. J., Ko, T. P., Hsu, C. S., Chen, C. J., Wang, A. H. J., et al. (2003). Crystal structure of D-aminoacylase from *Alcaligenes faecalis* DA1. *Journal of Biological Chemistry*, 278(7), 4957–4962.
- Locke, M., Atkinson, B. G., Tanguay, R. M., & Noble, E. G. (1994). Shifts in type I fiber proportion in rat hindlimb muscle are accompanied by changes in HSP72 content. *American Journal of Physiology*, 266, C1240–C1246.
- McArdle, A., Vasilaki, A., & Jackson, M. (2002). Exercise and skeletal muscle ageing: Cellular and molecular mechanisms. *Ageing Research Reviews*, 1, 79–93.
- Meunier, B., Bouley, J., Pic, I., Bernard, C., Picard, B., & Hocquette, J.-F. (2005). Data analysis methods for detection of differential protein expression in two-dimensional gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 340, 226–230.
- Monin, G., & Sellier, P. (1985). Pork of low technological quality with a normal rate of pH fall in the immediate post mortem period: The case of the Hampshire breed. *Meat Science*, 13, 49–63.
- Morzell, M., Terlouw, C., Chambon, C., Micol, D., & 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, 297–304.
- Müntener, M., Käser, L., Weber, J., & Berchtold, M. W. (1995). Increase of skeletal muscle relaxation speed by direct injection of parvalbumin cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 6504–6508.
- Neufer, P. D., & Benjamin, I. J. (1996). Differential expression of alpha-b-crystallin and HSP27 in skeletal muscle during continuous contractile activity. *Journal of Biological Chemistry*, 271(39), 24089–24095.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., & Ehrhardt, W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, 9, 255–262.
- Oishi, Y., Taniguchi, K., Matsumoto, H., Ishihara, A., Ohira, Y., & Roy, R. R. (2002). Muscle type-specific response of HSP60, HSP72, and HSC73 during recovery after elevation of muscle temperature. *Journal of Applied Physiology*, 92, 1097–1103.
- Pylypenko, O., Rak, A., Durek, T., Kushnir, S., Dursina, B. E., Thomae, N. H., et al. (2006). Structure of doubly prenylated Ypt1: GDI complex and the mechanism of GDI-mediated Rab recycling. *The EMBO Journal*, 25, 13–23.
- Richter, G. W., & Kellner, A. (1963). Hypertrophy of the human heart at the level of fine structure. *Journal of Cellular Biochemistry*, 18, 195–206.
- Rowe, L. J., Maddock, K. R., Lonergan, S. M., & Huff-Lonergan, E. (2004). Oxidative environments decrease tenderization of beef steaks through inactivation of mu-calpain. *Journal of Animal Science*, 82, 3254–3266.
- Rubio-Gayosso, I., Sierra-Ramirez, A., Garcia-Vasquez, A., Martinez-Martinez, A., Munoz-Garcia, O., Morato, T., et al. (2000). 17-*b*-Estradiol increases intracellular calcium concentration through a short-term and nongenomic mechanism in rat vascular endothelium in culture. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 36(2), 196–202.
- Sayd, T., Morzel, M., Chambon, C., Franck, M., Figwer, P., Larzul, C., et al. (2006). Proteome analysis of the sarcoplasmic fraction of pig semimembranosus muscle: Implication on meat color development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2732–2737.
- Seidel, C. L., Snabes, M., & MacLeod, J. (1981). Differences in F/G actin ratios in vascular and striated muscle. *Physiology*, 4(120).
- Shendelman, S., Jonason, A., Martinat, C., Leete, T., & Abeliovich, A. (2004). DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits alpha-synuclein aggregate formation. *PLoS Biology*, 2(11), 1764–1773.
- Srikakulam, R., & Winkelmann, D. A. (2004). Chaperone-mediated folding and assembly of myosin in striated muscle. *Journal of Cell Science*, 117, 641–652.
- Sugiyama, Y., Suzuki, A., Kishikawa, M., Akutsu, R., Hirose, T., Waye, M. M. Y., et al. (2000). Muscle develops a specific form of small heat shock protein complex composed of MKBP/HSPB2 and HSPB3 during myogenic differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 1095–1104.
- Taylor, R. G., Tassy, C., Briand, M., Robert, N., Briand, Y., & Ouali, A. (1995). Proteolytic activity of proteasome on myofibrillar structures. *Molecular Biology Reports*, 21(1), 71–73.
- Terlouw, E. M. C., & Rybarczyk, P. (2008). Explaining and predicting differences in meat quality through stress reactions at slaughter: The case of Large White and Duroc pigs. *Meat Science*, 79, 795–805.
- Terlouw, E. M. C., Berne, A., & Astruc, T. (submitted for publication). Effect of rearing and slaughter conditions on behaviour, physiology and meat quality of Large White and Duroc sired pigs. *Livestock Science*.
- Thompson, H. S., Maynard, E. B., Morales, E. R., & Scordilis, S. P. (2003). Exercise-induced HSP27, HSP70 and MAPK responses in human skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica*, 178, 61–72.
- Vibert, P., Craig, R., & Lehman, W. (1993). Three-dimensional reconstruction of caldesmon-containing smooth muscle thin filaments. *Journal of Cellular Biochemistry*, 123(2), 313–321.
- Yonezawa, N., Nishida, E., & Sakai, H. (1985). pH control of actin polymerization by cofilin. *Journal of Biological Chemistry*, 260(27), 14410–14412.

CHAPITRE 2

**Pig Longissimus lumborum proteome: Part II:
Relationships between protein content and meat quality.**



Contents lists available at ScienceDirect

Meat Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meatsci

Pig *Longissimus lumborum* proteome: Part II: Relationships between protein content and meat quality

A. Kwasiborski^a, T. Sayd^a, C. Chambon^a, V. Santé-Lhoutellier^a, D. Rocha^b, C. Terlouw^{a,*}

^aUR370 Qualité des Produits Animaux, INRA, F-63122 Saint-Genès Champanelle, France

^bGenus plc, Genus Cambridge Research Laboratory, Department of Pathology, University of Cambridge, CB2 1QP Cambridge, United Kingdom

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 October 2007

Received in revised form 14 February 2008

Accepted 30 April 2008

Available online xxx

Keywords:

Pig

Proteome

Meat quality

Longissimus lumborum

2D-electrophoresis

Biochemical pathways

ABSTRACT

Gender, rearing environment and breed of sire influenced 50.5% of the matched protein spots of the soluble fraction and some meat quality traits [Kwasiborski, A., Sayd, T., Chambon, C., Santé-Lhoutellier, V., Rocha, D., & Terlouw, C. (2008). Muscle proteome in pigs: Part I: Effects of genetic background, rearing environment and gender. *Meat Science*]. Multiple regression analyses determined that 1 or 2 proteins explained between 24% and 85% of variability in *Longissimus* meat quality. Regression models differed between treatment groups, but relationships between proteins and meat quality traits seemed to be related to common underlying mechanisms. Thus, proteins retained in models for ultimate pH, lightness, drip, thawing and cooking loss were related to the glycolytic pathway, phosphate transfer, or fibre type composition. Another model for thawing loss retained proteins related to denaturation of myofibrils or lipid content. The models for redness involved proteins related to *post-mortem* oxidative activity. Thus, proteins correlated with meat quality traits were related to biochemical mechanisms known to be involved in meat quality. Relative contributions of these mechanisms may vary according to gender, sire breed or rearing environment.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The importance of glycolytic, oxidative and proteolytic processes in the *post-mortem* muscle in the determination of ultimate technological and sensory meat quality is well recognised (Bendall, 1973; Rowe, Maddock, Lonergan, & Huff-Lonergan, 2004; Taylor et al., 1995). These processes are interdependent. For example, *post-mortem* glycolytic activity determines pH decline, which influences calpain activity rates (Huff-Lonergan & Lonergan, 2005). Calpain activity is further reduced by oxidation (Maddock, Huff-Lonergan, Rowe, & Lonergan, 2005). Metabolic processes give rise to formation of reactive oxygen species, increasing oxidative rate in the *post-mortem* muscle (Butterfield et al., 1998). Glycolytic, oxidative and proteolytic processes are further influenced by many factors, including rearing conditions and genetic background of the animal. For example, for a given muscle, genetic background, feeding regime and exercise may influence heme content, fat content, fatty acid profile and pro-oxidant activity, all characteristics that influence oxidative rate, as well as muscle glycogen content, potentially altering the *post-mortem* glycolytic rate (Gentry, Mc Glone, Miller, & Blanton, 2004; Mercier, Gatellier, & Renner, 2004; Morcuende, Estevez,

Ruiz, & Cava, 2003; Rosenvold & Andersen, 2003; Terlouw & Rybarczyk, 2008).

Little is known of the exact biochemical mechanisms that regulate glycolytic, oxidative and proteolytic processes and their interactions (Rosenvold & Andersen, 2003). Proteins play a central role as enzymes, but also as targets of oxidative and proteolytic activities, explaining the interdependency of these processes (Morzel et al., 2004; Renner, Dumont, & Gatellier, 1996). Proteomic studies screen a chosen fraction of the cellular protein content at a given moment, generally containing several hundred proteins, and allow identification of proteins that play a central role in meat quality, such as pork colour, drip loss or shear force (Hwang et al., 2004; Laville et al., 2007; Sayd et al., 2006). Similarly, over 90% of variability in beef tenderness was explained by variations in heat shock proteins (Morzel, Terlouw, Chambon, Micol, & Picard, 2008).

The objective of our work was to understand better the role of certain proteins and particularly of the biochemical cellular events they reflect, in animal and environment-related influences on meat quality. We reported in an earlier paper that various meat quality traits as well as 50.5% of the matched protein spots were influenced by rearing environment, breed of sire and/or gender of pigs (Kwasiborski et al., 2008). Many of the proteins were enzymes involved in energy or protein metabolism, or related to the contractile apparatus and may therefore influence meat quality. The objective of the present work was to identify proteins that may ex-

* Corresponding author. Present address: INRA, UR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès Champanelle, France. Tel.: +33 0 473 62 45 69.

E-mail address: Claudia.Terlouw@clermont.inra.fr (C. Terlouw).

plain variations in meat quality traits, and to describe how these relationships may vary between the different treatment groups. The relationships between meat quality trait and proteins are interpreted in terms of the biochemical status of the cell they reflect.

2. Materials and methods

2.1. Animals, housing and slaughter

Ten Large White \times Landrace sows were inseminated with mixed semen from PIC Duroc and Large White sires. From the about 100 piglets, 48 were selected, based on parenthood and weight. Pigs were born on the site in an outdoor farrowing system. They were weaned at 4 weeks and kept indoors until fattening at 2 months of age. Half of each sire breed was fattened indoors in four 2.2 \times 2.9 m pens with slatted floors in a heated and ventilated animal room of 4 \times 8.8 m. The other half was fattened outdoors on 850 m² parcels with little grass. Each parcel contained a 7.5 m² hut, a trough, a bowl drinker and a mud hole with water, as a bathing opportunity. There were six pigs (three females, three castrated males) from a single sire breed per pen or parcel. Pigs were put into the fattening system in April and slaughtered in October. Outdoor pigs were fed *ad libitum* while indoor pigs were slightly restricted in order to standardise slaughter weight at similar ages. Liquefied food was distributed at 0600 h and 1800 h.

Pigs were slaughtered at the age of about 8 months in a small local abattoir after a fasting period of 24 h. They were stunned on the floor with manually operated low voltage tongs. Slaughter took place on two different days, one-week apart, balanced for housing system and breed of sire. Five minutes after bleeding, a 5-g sample of the *Longissimus Lumborum* (LL) was excised and immediately frozen in liquid nitrogen. Upon arrival at the laboratory, the cups were stored at -80°C until used for the proteomic study. Muscle temperatures of the LL were measured at 15 and 45 min after bleeding. Samples were taken 45 min after bleeding to measure pH and for subsequent assay of lactate and glycogen contents. pH was measured on the spot with a glass electrode (In-lab 427, Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland), connected to a portable pH meter: Schött-Geräte, Germany after immediate homogenisation of the sample in 18 ml of 5 mM iodoacetate. Carcasses were cut 4 h after slaughter.

Twenty-four hours after slaughter, a 1-g muscle sample was taken for subsequent lactate and glycogen assays. Temperature, pH, redness (a^*), yellowness (b^*) and lightness (L^*) were recorded directly on the tissue of the muscle. Colour was measured using a Minolta Chromameter (CR-300, Minolta Corp., Osaka, Japan) equipped with a 0° viewing angle and using illuminant C.

To evaluate drip losses, a 2-cm-thick slice of the LL was cut at the level of the last rib 24 h after slaughter, suspended in a plastic bag and left at 4°C (Honikel, 1998). The amount of water lost was measured 72 (drip loss d3) and 120 h later (drip loss d5) and expressed as a percentage of the initial sample weight. To evaluate thawing losses, a 7-cm-thick sample was subsequently cut from the LL, weighed, vacuum packed, and frozen after ageing (4 days after slaughter). About 4 weeks later, samples were thawed overnight at $+4^{\circ}\text{C}$, unpacked and weighed after blotting. Thawing losses were expressed as the percentage of the initial sample weight. Samples were subsequently cut to a standardised size (5 \times 8 \times 4 cm.), weighed and vacuum packed. They were heated in a water bath at 70°C for 50 min and cooled in a $+4^{\circ}\text{C}$ water bath. They were then unpacked and weighed after removal of precipitated protein. Cooking losses were expressed as the percentage of the initial weight of the standardised-cut sample.

2.2. Glycogen and lactic acid assays

About 200 mg of lyophilised muscle was ground and suspended in 10 ml of perchloric acid 0.5 M. After hydrolysis of the glycogen by amyloglucosidase (Bergmeyer, 1974), glucose content of the homogenate was determined. Lactic acid was determined on the supernatant after centrifugation (20 min at 2500g) of the perchloric homogenate following Bergmeyer's (1974) procedure. Glycolytic potential (GP), the sum of compounds likely to produce lactic acid *post-mortem*, was calculated using the formula proposed by Monin and Sellier (1985). Concentrations are expressed as μmol lactate equivalents/g of fresh tissue.

For the present study 24 pigs were selected according to their GP and ultimate pH which were correlated ($r = -0.60$, $p < 0.0001$). Males and females were represented with different symbols in a scatter plot and the three higher and three lower values were selected for each genetic type and each rearing system, while balancing for gender (Kwasiborski et al., 2008).

2.3. Sarcoplasmic protein extraction, 2-dimensional electrophoresis and image analysis

Protein extraction, electrophoresis and image analysis were carried out according to the procedure described by Sayd et al. (2006). Frozen muscle was homogenised at 4°C using a glass bead agitator (Retsch, Haan, Germany) in a buffer made of 40 mM Tris HCl (pH 8.8), 2 mM EDTA, and a protease inhibitor cocktail. The homogenate was centrifuged (4°C , 10 min, 10,000g) and the supernatant, referred to as the soluble solution, was stored at -80°C . The protein content was determined using the Bradford method (Bradford, 1976).

For electrophoresis, 900 μg of sarcoplasmic proteins suspended in a urea 7 M, thio-urea 2 M and CHAPS 2% buffer were loaded onto immobilised pH gradient strips (pH 5–8, Biorad, Hercules, USA). Isoelectric focusing was performed using a Protean IEF cell system (Biorad). Gels were passively rehydrated for 16 h before application of rapid voltage ramping to reach a total of 85 kV h. For the second dimension, proteins were separated on 12% sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) gels using Protean II XL system (Biorad). Gels were stained with Coomassie Blue and were produced in triplicate, resulting in the production of 72 gels.

Gels were visualised and analysed using the two-dimensional electrophoresis image analysis software PDQuest (PDQuest User guide for version 7.1). Per gel, each detected and matched spot was normalised by expressing its relative intensity relative to the total intensity of all valid spots. PDQuest multiplies these relative values by 10^6 and expresses them in parts per million (ppm). For one sample and one spot the mean value calculated over the three gels was used for statistical analysis. An example of a gel can be found in Fig. 1.

2.4. Protein identification by mass spectrometry

Spots of interest were excised, and the proteins were subjected to in-gel tryptic digestion and peptide extraction using a Montage In-Gel Digest96 ZP kit (Millipore, Billerica, USA). Excised spots were washed using a 25 mM ammonium bicarbonate (NH_4HCO_3) and 5% (v/v) acetonitrile (ACN) solution and destained with a 25 mM NH_4HCO_3 and 50% (v/v) ACN solution. The spots were dehydrated using a 100% ACN solution and the proteins were digested overnight with a solution of 10 ng/ μl trypsin (V5111, Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) in 25 mM NH_4HCO_3 buffer (37°C). The peptides were extracted using a 100% ACN solution and analysed using a matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometer Voyager DE-Pro

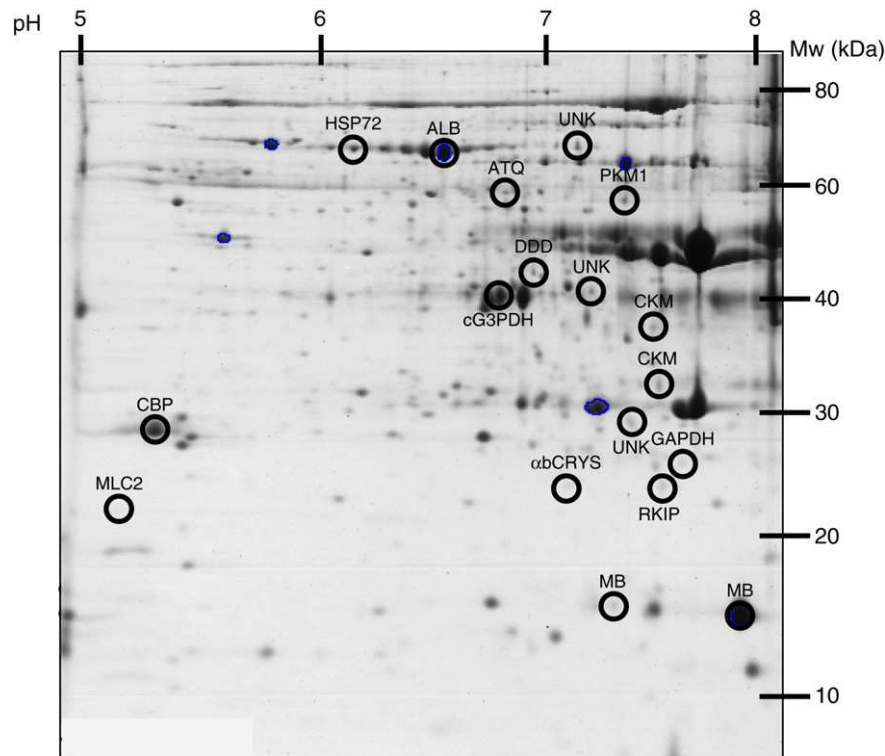


Fig. 1. Picture of a representative 2-dimensional gel of protein spots found in the used soluble fraction. Proteins explaining part of the variability in meat quality traits are in circles. MLC2; myosin light chain 2, CBP; Ca^{2+} binding protein, HSP72; inducible isoform of heat shock protein 70 kDa, ALB; albumin, ATQ; antitiquin, PKM1; pyruvate kinase isoform M1, DDD; dimeric dihydrodiol dehydrogenase, cG3PDH; cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase, CKM; muscular creatine kinase, GAPDH; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, α bCRY; α -b-crystallin, RKIP; raf kinase inhibitor protein, MB; myoglobin, UNK; unidentified protein.

model (Perspective BioSystems, Framingham, MA, USA). External calibration was performed with a standard peptide solution (Proteomix, LaserBio Labs, Sophia-Antipolis, France). Internal calibration was performed using peptides resulting from auto-digestion of porcine trypsin. Proteins were identified from their peptide mass fingerprint by searching the National Center for Biotechnology Information (NCBI) protein sequence database using the MASCOT and PROFOUND softwares (<http://www.matrixscience.com> and <http://prowl.rockefeller.edu>). The initial search parameter allowed a single trypsin missed cleavage, carbamidomethylation of cysteine, partial oxidation of methionine, and a mass accuracy of 25 ppm.

2.5. Statistical analysis

Statistical procedures and analysis were carried out using XLstat addinsoft version 7.5.3 (Microsoft Corporation, Seattle, USA). Intensity-dependent normality of the distribution was verified according to Meunier et al. (2005). Normal distribution of data was verified using the Shapiro–Wilk test and proteins with abnormal distributions were normalised using the Box–Cox procedure.

Pearson correlations were calculated between proteins and meat quality traits. All pigs were included in the regressions if the analysis of variance (Kwasiborski et al., 2008) had not identified any main or interactive effect of breed of sire, rearing environment or gender, on the relevant variables. If a main effect was found, regressions were carried out per treatment group ($n = 12$) on compatible data (i.e. the protein list combined proteins influenced by the same treatment as the meat quality trait, and proteins influenced by none of the treatments). Where several or interactive treatment effects were found, regression analyses were carried out on each of the main treatment groups ($n = 12$). To ensure absence of bias due to other treatment effects (i.e. to validate the regression analyses), within each treatment group ($n = 12$) pooled Pearson

correlations were calculated between the explained and each explanatory variable. These calculate correlations over i treatment groups and j observations using the formula $\frac{\sum \sum (x_{ij} - \bar{x}_i)(y_{ij} - \bar{y}_i)}{\sqrt{\sum \sum \sum (x_{ij} - \bar{x}_i)^2 (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}}$, where \bar{x}_i and \bar{y}_i are means of the i th treatment group. As these correlations are based on treatment rather than overall means they allow pooling of data over treatments while correcting for treatment effects (Crunch manual, 1991). One-sided binomial unilateral analyses were carried out to check whether the proportion of proteins correlated with a given meat quality trait was greater than the proportion expected by chance (5%).

Subsequently, multiple forward stepwise regression analysis was carried out for each meat quality parameter, fitting correlated proteins as explanatory variables. The models explaining most variability are presented. The percentage of variability in meat quality traits explained by proteins is based on the adjusted r^2 value of the regression analysis $\times 100\%$. As the studied meat quality traits are also often related to ultimate pH and GP (Offer & Cousins, 1992; Rennerre, 1990), the multiple regression models were tested again adding ultimate pH and GP as possible explanatory variables. Results are only presented if inclusions of these variables were significant in the model.

When a significant model is found for a given meat quality trait, this means that the variations in contents of this (these) specific protein(s) across samples match best variations in this meat quality trait. The proteins found to be significant in the models are specific for the cases studied in the present experiment. The biochemical status of the cell they represent are probably of a larger interest. Proteomic data sets show many cross-correlations between proteins that can consequently be re-grouped in clusters, representing similar biochemical phenomena (Laville et al., 2007; Sayd et al., 2006). Therefore, relationships between proteins and meat quality traits were interpreted in terms of biochemical status

of the muscle cell they reflect. To facilitate interpretation of the biological significance of proteins that were unidentified or of which the biochemical role was unclear, a Pearson Principal Component Analysis (PCA) was carried out on the relevant treatment group, including the protein retained by the regression model,

Table 1

Number of proteins and isoforms, classified according to their functions, influenced by the three treatment factors; rearing environment, breed of sire and/or gender (for details, see Kwasiborski et al., 2008)

Protein function	Treatment factor		
	Rearing environment	Breed of sire	Gender
Glycolytic pathway	3	2	15
Citric acid pathway			3
Chaperone, regulation and detoxification	6	2	9 ^a
Myofibrillar and cytoskeleton structure	2	1	12 ^b
Phosphotransferase			4
Oxygen binding	2		
Iron binding			2
Miscellaneous	2	1	17
Unidentified	7	4	26 ^c
Total	22	10	88

^a Four of these proteins received also a main effect of rearing environment.

^b One of these proteins received also a main effect of rearing environment.

^c Four of these proteins received also a main effect of rearing environment.

identified proteins correlated with this protein, its isoforms, and if needed, myofibrillar proteins as markers of metabolic activity (Kwasiborski et al., 2008). If results of the PCA are not shown in a figure, % of variance explained by the relevant axis will be indicated in the text between brackets.

3. Results

As indicated in detail by Kwasiborski et al. (2008) rearing environment, breed of sire and gender influenced 22, 10, and 88 proteins of the soluble fraction, respectively, representing 50.5% of the matched spots (Table 1), and 6 out of the 15 measured meat

Table 2

Average and standard deviation of meat quality parameters not influenced by treatment factors; rearing environment, breed of sire and/or gender

	Meat quality	Average on 24 pigs	SEM
45 min	pH	6.54	0.17
	Lactate	46.32	16.17
	Glycolytic potential	132.76	26.31
	Temperature	38.95	0.85
Water loss	Drip loss d5	2.16	0.86
	Cooking loss	19.17	4.04
Colour	L^*	52.38	5.30
	a^*	8.30	1.76
	b^*	4.43	1.89

Table 3

Effects of treatment factors or their interactions on meat quality parameters

Meat quality	Observed effect	Type of animals	Mean	SEM	P-Value			
45 min	Glycogen	Rearing environment × Breed of sire	Indoor × Duroc	31.12 ^a	9.86	0.03		
		Indoor × Large White	45.30 ^c	10.76				
		Outdoor × Duroc	38.78 ^b	9.86				
		Outdoor × Large White	37.49 ^b	17.66				
		Breed of sire × Gender	Duroc × Female	30.66 ^a	9.08		0.02	
	Duroc × Castrated male	39.23 ^a	6.89					
	Large White × Female	50.06 ^b	6.54					
	Large White × Castrated male	32.73 ^a	13.93					
	24 h	pH	Gender	Female	5.47	0.09		0.003
			Castrated male	5.63	0.23			
Rearing environment × Breed of sire			Indoor × Duroc	5.62 ^b	0.18	0.004		
Indoor × Large White			5.45 ^a	0.10				
Outdoor × Duroc			5.50 ^a	0.05				
Outdoor × Large White		5.62 ^b	0.33					
Lactate		Gender	Female	77.61	5.71		0.02	
		Castrated male	66.71	12.94				
		Glycogen	Breed of sire	Duroc	9.88	2.89		0.03
			Large White	11.96	4.24			
	Gender		Female	12.44	3.43	<0.0001		
Castrated male	9.40		3.48					
Rearing environment × Breed of sire	Indoor × Duroc		8.21 ^a	2.52	0.001			
Indoor × Large White	12.84 ^b	3.06						
Outdoor × Duroc	11.55 ^b	2.65						
Outdoor × Large White	11.07 ^b	5.64						
Breed of sire × Gender	Duroc × Female	9.73 ^a	2.54	40.02				
Duroc × Castrated male	10.02 ^a	3.20						
Large White × Female	15.14 ^b	1.54						
Large White × Castrated male	8.77 ^a	3.64						
Water loss	Drip loss d3	Breed of sire	Duroc		3.38	1.13	0.02	
		Large White	5.21	2.43				
	Thawing loss	Breed of sire	Duroc	11.68	2.11	0.02		
		Large White	13.73	3.63				
		Gender	Female	14.12	3.17		0.001	
		Castrated male	11.30	2.38				
		Rearing environment × Breed of sire	Indoor × Duroc	10.58 ^a	2.59			<0.0001
		Indoor × Large White	15.89 ^b	2.42				
		Outdoor × Duroc	12.79 ^a	1.04				
		Outdoor × Large White	11.57 ^a	2.59				

^{a,b,c} Different letters indicate significant differences between treatment groups ($p < 0.05$).

Table 4
MALDI-ToF spectrometry identifications of proteins related to meat quality (after Kwasiborski et al., 2008)

Spot no.	Protein name ^a	Accession no. ^a	Organism	Mascot score ^b	% cov ^c	MP ^d	Theoretical MW/pi ^e	Observed MW/pi ⁵	Spot quantity ^f	p ^g	
<i>Proteins involved in model uninfluenced by any treatment factors</i>									<i>All animals</i>		
<i>Glycolytic pathway</i>											
7018	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	AAC16069	<i>Ovis aries</i>	57	32	6	19.7/6.65	26.0/7.00	188.2		
<i>Miscellaneous</i>											
4526	Albumin	CAA30970	<i>Sus scrofa</i>	80	21	14	69.4/5.92	68.0/6.20	78853.7		
5229	Unidentified protein								1015.4		
5511	Unidentified protein								346.0		
<i>Proteins involved in model influenced by rearing environment</i>									<i>Indoor</i>	<i>Outdoor</i>	
<i>Chaperone regulation and detoxification</i>											
2516	Heat shock protein 72 kDa	AAR30953	<i>Sus scrofa</i>	178	54	27	72.0/5.60	68.0/5.90	5695.0	8348.1	**
<i>Oxygen binding</i>											
6004	Chain B, Myoglobin	1MNIB	<i>Sus scrofa</i>	86	54	8	16.9/6.83	15.5/7.20	186.5	323.8	*
<i>Miscellaneous</i>											
2307	Aminoacylase 1	CAA48565	<i>Sus scrofa</i>	123	37	14	45.3/5.61	45.5/5.75	139.6	124.4	
2104	Unidentified protein								310.3	302.3	
<i>Proteins involved in model influenced by breed of sire</i>									<i>Duroc</i>	<i>Large White</i>	
<i>Glycolytic pathway</i>											
4418	Pyruvate kinase isozyme M1	P11979	<i>Sus scrofa</i>	114	39	24	56.7/7.32	50.0/6.50	302.4	134.6	*
5414	Pyruvate kinase isozyme M1	1PKM	<i>Felis catus</i>	113	22	13	56.8/7.32	50.0/6.75	514.6	483.6	
6315	Pyruvate kinase isozyme M1	P11979	<i>Felis catus</i>	140	45	27	56.8/7.32	52.0/7.30	178.0	123.7	
4110	Cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	AAB58703	<i>Sus scrofa</i>	89	54	9	19.9/5.03	41.0/6.70	26402.6	25192.9	
4205	Cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	AAB58703	<i>Sus scrofa</i>	100	49	10	19.9/5.03	41.0/6.35	4045.0	4832.3	
4207	β-Enolase 3	XP_536606	<i>Sus scrofa</i>	123	43	15	47.1/8.05	43.0/6.45	2715.3	3043.2	*
5313	β-Enolase 3	Q1KYTO_PIG	<i>Sus scrofa</i>	110	43	20	47.1/8.05	47.0/6.80	10667.8	14020.5	*
6518	Phosphoglyceratemutase-1	P00949	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	102	21	10	61.4/6.62	62.0/7.25	59542.3	63792.8	
4001	Triosephosphate isomerase	NP_001013607	<i>Bos taurus</i>	109	54	11	26.7/6.45	31.0/6.40	741.7	890.2	
<i>Citric acid cycle</i>											
3518	Malate dehydrogenase	CAA63599	<i>Sus scrofa</i>	133	30	17	62.0/5.44	63.0/6.20	1555.6	1120.8	
<i>Oxygen binding</i>											
7005	Chain B, Myoglobin	1MNIB	<i>Sus scrofa</i>	86	54	8	16.9/6.83	15.5/7.20	10175.1	9256.0	
8026	Chain B, Myoglobin	1MNIB	<i>Sus scrofa</i>	86	54	8	16.9/6.83	15.5/7.20	155404.7	146904.4	
<i>Chaperone and regulation</i>											
2516	Heat shock protein 72 kDa	AAR30953	<i>Sus scrofa</i>	178	54	27	72.0/5.60	68.0/5.90	7023.0	7020.2	
<i>Myofibrillar and cytoskeleton structure</i>											
31	Myosin light chain 2	NP_001006592	<i>Sus scrofa</i>	121	64	10	19.0/4.90	18.0/4.90	3946.4	3301.9	
34	Myosin light chain 2	CAA46931	<i>Homo sapiens</i>	81	59	7	18.8/4.92	21.0/4.90	514.6	483.6	
1006	Myosin light chain 2	NP_001006592	<i>Sus scrofa</i>	151	80	13	19.0/4.90	18.0/5.20	592.9	577.8	
1015	Myosin light chain	CAA64353	<i>Sus scrofa</i>	72	47	10	22.4/4.63	28.0/5.20	891.4	739.5	
105	Tropomyosine 2 beta	NP_033442	<i>Mus musculus</i>	104	34	13	32.8/4.66	40.0/4.80	3171.7	3145.6	
110	Tropomyosin 1 alpha	AAI02910	<i>Bos taurus</i>	192	47	19	32.7/4.69	38.0/4.80	6802.0	8014.9	
1335	Chain A. Structural Basis Of Actin	1T44A	<i>Sus scrofa</i>	191	48	17	41.2/5.55	47.0/5.45	1513.3	1841.8	
1336	Chain A. Structural Basis Of Actin	1T44A	<i>Sus scrofa</i>	191	48	17	41.2/5.55	47.0/5.45	21068.3	23891.2	
<i>Miscellaneous</i>											
6119	Unidentified protein								84.6	98.0	
<i>Proteins involved in model influenced by gender</i>									<i>Castrated male</i>	<i>Female</i>	
<i>Glycolytic pathway</i>											
4207	β-Enolase 3	XP_536606	<i>Sus scrofa</i>	123	43	15	47.1/8.05	43.0/6.45	2438.2	3320.3	*
5217	β-Enolase 3	XP_536606	<i>Sus scrofa</i>	101	30	10	47.1/8.05	44.0/6.65	666.4	490.5	
5313	β-Enolase 3	ABC75829	<i>Sus scrofa</i>	110	43	20	47.1/8.05	47.5/6.80	8542.5	16145.8	
4205	Cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	AAB58703	<i>Sus scrofa</i>	100	49	10	19.9/5.03	41.0/6.35	3751.8	5125.6	
4110	Cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	AAB58703	<i>Sus scrofa</i>	89	54	9	19.9/5.03	41.0/6.70	24777.6	26817.9	
4521	Phosphoglyceratemutase-1	P00949	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	102	21	10	61.4/6.62	62.0/7.25	1064.8	1365.9	
6518	Phosphoglyceratemutase-1	P00949	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	102	21	10	61.4/6.62	62.0/7.25	54966.4	68368.7	*
6116	Triosephosphate isomerase	NP_001013607	<i>Sus scrofa</i>	107	44	10	26.7/6.45	32.5/6.95	164.3	279.1	**
4001	Triosephosphate isomerase	NP_001013607	<i>Bos taurus</i>	109	54	11	26.7/6.45	31.0/6.40	751.7	880.2	
<i>Phosphotransferase</i>											
6113	Muscular creatine kinase	AAZ66747	<i>Sus scrofa</i>	84	25	12	43.3/6.61	32.5/7.25	512.2	754.9	*
7107	Muscular creatine kinase	AAZ66747	<i>Sus scrofa</i>	88	28	12	43.0/6.61	32.5/7.40	348.5	495.7	*
7220	Muscular creatine kinase	AAZ66748	<i>Sus scrofa</i>	170	38	16	43.0/6.61	39.0/7.40	1324.5	1880.5	**
<i>Myofibrillar and cytoskeleton structure</i>											
6617	Actin interacting protein 1	C_AH_92333	<i>Pongo pigmaeus</i>	163	37	19	66.1/6.21	66.0/7.10	194.4	224.0	*
12	Ca2+-binding protein-like protein	AAX77006	<i>Sus scrofa</i>	80	52	8	16.6/4.63	12.0/4.80	4684.8	2471.9	*
38	Ca2+-binding protein-like protein	AAX77006	<i>Sus scrofa</i>	80	52	8	16.6/4.63	12.0/4.80	15070.4	8043.5	***

(continued on next page)

Table 4 (continued)

Spot no.	Protein name ^a	Accession no. ^a	Organism	Mascot score ^b	% cov ^c	MP ^d	Theoretical MW/pi ^e	Observed MW/pi ⁵	Spot quantity ^f	p ^g	
1335	Chain A. Structural Basis Of Actin	1T44A	<i>Sus scrofa</i>	191	48	17	41.2/5.55	47.0/5.45	2877.0	478.1	**
1336	Chain A. Structural Basis Of Actin	1T44A	<i>Sus scrofa</i>	191	48	17	41.2/5.55	47.0/5.45	37194.0	7765.5	***
1015	Myosin light chain	CAA64353	<i>Sus scrofa</i>	72	47	10	22.4/4.63	28.0/5.20	936.9	694.1	***
31	Myosin light chain 2	NP_001006592	<i>Sus scrofa</i>	121	64	10	19.0/4.90	18.0/4.90	6770.5	477.7	*
34	Myosin light chain 2	CAA46931	<i>Homo sapiens</i>	81	59	7	18.8/4.92	21.0/4.90	140.9	1.5	**
1006	Myosin light chain 2	NP_001006592	<i>Sus scrofa</i>	151	80	13	19.0/4.90	18.0/5.20	816.7	353.9	*
6208	Troponin T fast skeletal muscle type	BAD15377	<i>Sus scrofa</i>	129	41	17	32.1/6.00	42.5/7.20	2303.4	523.8	*
Chaperone regulation and detoxification											
5020	α -b-Crystallin	7441290	<i>Sus scrofa</i>	92	41	7	20.1/6.76	23.5/7.10	130.2	1.5	*
4007	Superoxide dismutase		<i>Sus scrofa</i>	90	53	8	15.2/6.04	15.5/6.40	5843.8	8611.5	
Miscellaneous											
4411	Antiquitin	AAH02515	<i>Homo sapiens</i>	176	45	22	58.7/8.00	55.0/6.55	797.4	1159.4	***
5203	Dimeric dihydrodiol dehydrogenase	NP_999331	<i>Sus scrofa</i>	189	43	17	36.5/6.34	43.0/6.75	781.8	1044.4	**
3018	Fatty acid binding protein 3	AAT72764	<i>Sus scrofa</i>	58	56	7	13.2/6.95	16.1/5.73	33.5	41.7	
2302	Mitochondrial Cytochrome Bc1 Complex	1QCRA	<i>Bos taurus</i>	100			49.2/5.46	50.0/5.60	648.7	47.4	***
5021	Raf kinase inhibitor protein	1A44	<i>Bos taurus</i>	70	38	6	20.7/6.62	24.0/7.45	88.8	128.6	
7017	Raf kinase inhibitor protein	1A44	<i>Bos taurus</i>	70	38	6	20.7/6.62	24.0/7.45	138.2	28309.0	*
5511	Unidentified protein								386.9	305.1	
6007	Unidentified protein								198.7	1.5	

^a Protein names and accession numbers were derived from the NCBI database.

^b Mascot scores greater than or equal to 68 are significant ($p < 0.05$).

^c Percentage of coverage of the entire amino acid sequence.

^d Number of matched peptides.

^e MW and pi: theoretical (recorded in NCBI database) and observed (calculated from the spot position on the gel).

^f Spot quantity: average quantity in treatment groups.

^g Significant treatment effects are indicated: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

quality traits (Tables 2 and 3). Identifications of proteins are presented in Table 4.

3.1. Relationships between protein expression and meat quality

GP, pH45 and T45 were not influenced by treatment factors (Table 2) and correlation coefficients were calculated using the 24 pigs (Table 5). Binomial analyses show that the amount of proteins correlated with these traits was lower than expected by chance (Table 5). Fifty-four percent of the variability of LL temperature 45 min *post-mortem* was explained by the blood binding-protein albumin (ALB) and the sixth enzyme in the glycolytic pathway glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). A much smaller percentage of GP and rate of pH decline could be explained by protein levels. An unidentified protein explained 24% of the variability of the GP and another unidentified protein explained 24% of the variability of pH 45.

As the other meat quality traits or correlated proteins were influenced by treatment factors, multiple regressions were carried

out per treatment group (Table 6). In castrated males, cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase (cG3PDH) explained 67% of ultimate pH variability. cG3PDH is involved in the glycerol-phosphate shuttle, oxidising NADH, H⁺ into NAD⁺, and important for glycolysis (Haddock & Jones, 1977; Holloszy & Booth, 1976). In females, 2 proteins were retained in the model: the muscular isoform of creatine kinase (CKM), belonging to the phosphotransferase family and reversibly catalysing the transfer of phosphate between ATP and various phosphogens such as creatine phosphate, and dimeric dihydrodiol dehydrogenase (DDD), an enzyme with high reductase activity for dicarbonyl compounds, aldehydes and ketones (Aoki, Ishikura, Asada, Usama, & Hara, 2001; Arimitsu et al., 1999). This model explained 83% of ultimate pH variability. DDD levels charged onto the first PCA axis (45%) in the same direction as 4 myosin light chain 2 (MLC2) isoforms and 2 actin isoforms (ACT) and oppositely to β enolase 3 (ENO3 β), the before-last enzyme of the glycolytic pathway.

Redness (a^*) was correlated ($p < 0.05$) with pH 45 min *post-mortem* in castrated males ($r = -0.58$) and females ($r = -0.69$). The

Table 5
Proteins correlated with meat quality parameters (Pearson correlations: r and p -values) and results (p -values, adjusted r^2) of the multiple forward stepwise regression analysis carried out on the meat quality parameter fitting all correlated proteins

Meat quality	Spot no.	Protein	Pearson		Multiple regression	
			r	p	p	adjusted r^2
GP	5511	Unidentified protein	-0.524	0.009	0.009	24
	2106	L-lactate dehydrogenase B chain	-0.495	0.01		
	3302	Aldehyde dehydrogenase E3'	-0.454	0.03		
	3101	Peroxiredoxin 6	-0.419	0.04		
	6211	Troponin T fast skeletal muscle type	0.520	0.009		
pH45	5229	Unidentified protein	-0.525	0.009	0.009	24
	4618	Albumin	-0.514	0.010		
	5407	Unidentified protein	-0.473	0.020		
	2209	Four and a half LIM domains 3	-0.451	0.027		
	1511	Chaperonin	-0.439	0.032		
T45	4526	Albumin	-0.659	0.001	0.005	54
	7018	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	0.592	0.005	0.018	
	7005	Myoglobin	0.498	0.02		

Proteins in bold letter type indicate those retained by the multiple regression model. This table represents meat quality and protein data not influenced by treatment factors.

Table 6

Proteins correlated with meat quality parameters (Pearson correlations: r and p -values) and results (p -values, adjusted r^2) of the multiple forward stepwise regression analysis carried out on the meat quality parameter fitting all correlated proteins

Meat quality	Subgroup ^a	Spot no.	Protein	Pearson		Multiple regression		
				r	p	p	adjusted r^2	
Ultimate pH	Castrated male	4110	Cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	-0.839	0.001	0.001	67	
		4408	Chain B, Leucine Aminopeptidase	0.624	0.040			
		7018	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	0.6060	0.048			
		3518	Malate dehydrogenase	0.629	0.038			
		5021	Raf kinase inhibitor protein	0.610	0.046			
			as well as an unidentified protein					
	Female ***	7220	Muscular creatine kinase	-0.829	0.001	<0.0005	83	
		5203	Dimeric dihydrodiol dehydrogenase	0.591	0.043	0.008		
		3302	Aldehyde dehydrogenase E3'	0.623	0.030			
		1335	Chain A,	0.675	0.016			
		1336	Chain A, Structural Basis Of Actin	0.649	0.022			
		6110	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	0.631	0.027			
		3101	Peroxiredoxin 6	0.627	0.029			
		4418	Pyruvate kinase isoform M1	0.673	0.016			
		6315	Pyruvate kinase isoform M1	0.668	0.018			
		5021	Raf kinase inhibitor protein	0.577	0.049			
		4305	S-Adenosylhomocysteine hydrolase	-0.670	0.017			
		5401	Tripartite motif protein 50, partial	0.704	0.011			
				as well as 7 unidentified proteins				
		Drip loss 3	Large White **	6315	Pyruvate kinase isoform M1	0.81	<0.005	<0.001
7006				Adenylate kinase 1	-0.766	0.004		
3422	Aldehyde dehydrogenase			0.661	0.019			
1302	ATP synthase beta subunit			0.740	0.006			
11	Ca2+-binding protein-like protein			-0.761	0.004			
12	Ca2+-binding protein-like protein			-0.758	0.004			
1335	Chain A, Structural Basis Of Actin			-0.657	0.020			
4110	Cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase			-0.631	0.028			
2004	Dj1 protein			-0.600	0.039			
3018	Fatty acid binding protein 3			-0.633	0.027			
5009	Glutathione transferase class pi 2			0.627	0.029			
3015	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase			0.724	0.008			
3303	Guanosine diphosphate dissociation inhibitor 2			-0.617	0.033			
3509	Heat shock 70 kDa			-0.671	0.017			
3115	Myosin light chain 1			-0.780	0.003			
31	Myosin light chain 2			-0.591	0.043			
34	Myosin light chain 2			-0.649	0.022			
2006	Proteasome beta 4			0.787	0.002			
1330	Succinyl-CoA synthetase			-0.637	0.026			
6125	Triosephosphate isomerase			0.598	0.040			
5401	Tripartite motif protein 50, partial		-0.636	0.026				
5014	WD repeat domain		0.653	0.021				
			as well as 5 unidentified proteins					
	Duroc		8026	Myoglobin	-0.637	0.035		34
				as well as 2 unidentified proteins				
Cooking loss	Castrated Male		6007	Unidentified protein	0.594	0.042	<0.001	78
			4411	Antiquitin	0.708	0.010	0.015	
		8027	α -Hemoglobin	0.603	0.038			
		3302	Aldehyde dehydrogenase E3'	0.620	0.032			
		1302	ATP synthase beta subunit	0.638	0.026			
		5021	Raf kinase inhibitor protein	0.686	0.014			
		6208	Troponin T	-0.696	0.012			
		6211	Troponin T	-0.645	0.024			
				as well as 3 unidentified proteins				
			Female	5020	α-b-crystallin	0.618	0.032	<0.001
	34	Cardiac ventricular myosine light chain 2		0.623	0.031	<0.001	32	
	4526	Albumin		-0.682	0.013			
	6602	Transferrin		-0.638	0.026			
	6211	Troponin T		0.761	0.004			
				as well as 4 unidentified proteins				
	L⁺	Indoor rearing^c	2104	Unidentified protein	-0.789	0.002	0.004	58
2307			Aminoacylase 1	-0.625	0.030			
5227			Cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	-0.641	0.025			
2004			Dj1 protein	-0.674	0.016			
4204			Isocitrate dehydrogenase	0.576	0.050			
4408			Leucine Aminopeptidase	-0.639	0.025			
13			Parvalbumin	0.655	0.021			
4108			Pyridoxine 5'-phosphate oxidase	0.705	0.010			
5613			Transferrin	0.617	0.033			
				as well as 2 unidentified proteins				

(continued on next page)

Table 6 (continued)

Meat quality	Subgroup ^a	Spot no.	Protein	Pearson		Multiple regression				
				r	p	p	adjusted r ²			
a	Outdoor rearing⁺	6004	Chain B, Myoglobin	-0.726	0.007	<0.001 0.001	84			
		2516	Heat shock protein 72 kDa	-0.617	0.033					
		5227	Cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	-0.641	0.025					
		5203	Dimeric dihydrodiol dehydrogenase	-0.640	0.025					
		2004	Dj1 protein	-0.611	0.035					
		2106	Lactate dehydrogenase	-0.693	0.013					
		6004	Myoglobin	-0.726	0.007					
		5021	Raf kinase inhibitor protein	-0.607	0.036					
			as well as an unidentified protein							
	Castrated Male^{**}	7107	Muscular creatine kinase	0.717	0.009	0.009 0.008 0.014	47 69 85			
		3302	Aldehyde dehydrogenase E3'	-0.835	0.001					
		4110	Cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	0.592	0.043					
		4323	Enolase 1	-0.701	0.011					
		6113	Muscular creatine kinase	0.786	0.002					
		7220	Muscular creatine kinase	0.598	0.040					
		3101	Peroxiredoxin 6	-0.708	0.010					
		5021	Raf kinase inhibitor protein	-0.671	0.017					
		6211	Troponin T	0.887	<0.001					
			as well as 8 unidentified proteins							
		Female[*]	38	Ca²⁺-binding protein-like protein	0.689			0.013		
			7017	Raf kinase inhibitor protein	-0.648			0.023		
			5104	CGI-29 protein	-0.579			0.048		
			4408	Leucine Aminopeptidase	-0.581			0.047		
			4410	Leucine Aminopeptidase	0.643			0.024		
			7107	Muscular creatine kinase	-0.634			0.027		
6004	Myoglobin		-0.650	0.022						
5513	Phosphoglucomutase 1		-0.801	0.002						
6518	Phosphoglucomutase 1		-0.617	0.033						
	as well as 6 unidentified proteins									
Thawing loss	Duroc^{**}	4110	Cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	0.862	<0.001	0.006	72			
		2206	Galactokinase	-0.727	0.007					
		2103	MGC128999 protein	-0.578	0.049					
		7107	Muscular creatine kinase	0.626	0.029					
		4521	Phosphoglucomutase 1	0.698	0.012					
		as well as 4 unidentified proteins								
	Large White^{***}	6119	Unidentified protein	-0.816	0.001	0.001 <0.0001	85			
		2516	Heat shock protein 72 kDa	-0.666	0.018					
		3302	Aldehyde dehydrogenase E3'	-0.581	0.048					
		3202	Aminoacylase 1	-0.688	0.013					
		2113	Annexin A4	-0.590	0.043					
		4207	βenolase 3	0.601	0.039					
		5313	βenolase 3	0.688	0.013					
		34	Myosin light chain 2	-0.617	0.032					
		4204	Chain a isocitrate dehydrogenase	0.653	0.021					
		3422	Chain D aldehyde dehydrogenase	-0.667	0.018					
		8015	Cofilin 2	-0.674	0.016					
		2004	Dj1 protein	-0.712	0.009					
		3303	Guanosine diphosphate dissociation inhibitor 2	-0.705	0.010					
		2516	Heat shock protein 72 kDa	-0.666	0.018					
		3518	Malate dehydrogenase	0.681	0.015					
		1015	Myosin light chain	-0.733	0.007					
		6315	Pyruvate kinase isozyme M1	-0.663	0.019					
		4001	Triosephosphate isomerase	-0.693	0.013					
		6125	Triosephosphate isomerase	0.639	0.025					
			as well as 14 unidentified proteins							
		Castrated Male⁺	6617	Actin interacting protein 1	0.668			0.018	0.004	85
			3302	Aldehyde dehydrogenase E3'	-0.718			0.008		
			6117	Carbonic anhydrase 3	-0.586			0.045		
			6004	Chain B myoglobin	-0.724			0.008		
			6017	Chain B myoglobin	-0.605			0.037		
			7005	Chain B myoglobin	-0.718			0.009		
			6107	Esterase D	-0.648			0.023		
			2516	Heat shock protein 72 kDa	-0.613			0.034		
			3101	Peroxiredoxin 6	-0.630			0.028		
5021			Raf kinase inhibitor protein	-0.732	0.007					
4007	Superoxide dismutase		-0.608	0.036						
6617	WD repeat domain		0.668	0.018						
	as well as an unidentified protein									

Table 6 (continued)

Meat quality	Subgroup ^a	Spot no.	Protein	Pearson		Multiple regression	
				<i>r</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	adjusted <i>r</i> ²
	Female^{***}	5511	Unidentified protein	−0.894	<0.0001	<0.0001	78
		6617	Actin interacting protein 1	−0.882	<0.001		
		3202	Aminoacylase 1	−0.718	0.009		
		2113	Annexin A4	−0.637	0.026		
		4207	βenolase 3	0.766	0.004		
		4213	βenolase 3	0.609	0.035		
		5216	βenolase 3	0.626	0.029		
		5313	βenolase 3	0.743	0.006		
		1336	Chain A, Structural Basis Of Actin	−0.688	0.013		
		8015	Cofilin 2	−0.669	0.017		
		2302	Cytochrome Bc1	−0.681	0.015		
		4205	Cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	0.649	0.022		
		5321	Enolase 1	−0.710	0.010		
		2206	Galactokinase	−0.610	0.035		
		5009	Glutathione transferase class π 2	0.606	0.037		
		4613	Glycyl-tRNA synthetase	−0.636	0.026		
		3308	Guanosine diphosphate dissociation inhibitor 2	−0.602	0.038		
		1610	Heat shock cognate 70 kDa	−0.617	0.033		
		2615	Heat shock protein 73 kDa	−0.728	0.007		
		1006	Myosin light chain 2	−0.704	0.011		
		13	Parvalbumin α	0.634	0.027		
		4305	S-Adenosylhomocysteine hydrolase	0.579	0.049		
		2305	Secernin 3	−0.718	0.009		
		1330	Succinyl-CoA synthetase	−0.600	0.039		
		4001	Triosephosphate isomerase	0.657	0.020		
		5401	Tripartite motif protein 50, partial	−0.641	0.025		
		3418	Xaa-Pro dipeptidase as well as 26 unidentified proteins	−0.824	0.001		

Proteins in bold letter type indicate those retained by the multiple regression model. This table represents meat quality and protein data influenced by treatment factors. Pearson correlations (*r* and *p*-values) of unidentified proteins not retained by the multiple regression model are not shown.

^a Binomial analyses were used to determine whether number of correlations are greater than expected by chance (5%): * : *p* < 0.1; † : *p* < 0.05; †† : *p* < 0.01; ††† : *p* < 0.001.

regression analysis found that in castrated males, an isoform of CKM explained 47% of variability in red colour (*a*^{*}). If included in the explanatory variables, GP was maintained in the model, in addition to the CKM isoform, improving the explanatory power of the model by 20%. In the PCA, this isoform loaded on the first axis in the same direction as 2 other CKM isoforms and cG3PDH (Fig. 2a). In females, regression analysis showed that 69% of *a*^{*} variability was explained by a calcium binding protein (CBP), implicated in the regulation of intracellular calcium content, and a Raf kinase inhibitor protein (RKIP) isoform, involved in several cell signalling cascades (Hagan, Garcia, Dhillon, & Kolch, 2006; Keller, Fu, & Brennan, 2004). CBP loaded on the first PCA axis in the same direction as another CBP isoform, MLC2 and isoform 1 of superoxide dismutase (SOD1), catalysing the dismutation of superoxide anions (Zelko, Thomas, & Folz, 2002), and in the opposite direction as fast Troponin T (TnT), involved in myofibrillar structure, and isoform 1 of phosphoglycerate mutase (PGM1), catalysing the conversion of 3-phosphoglycerate into 2-phosphoglycerate (Fig. 2b). In the PCA, RKIP loaded on the first (52%) axis in the same direction as another RKIP isoform, triosephosphate isomerase (TPI), which catalyses the reversible interconversion of dihydroxyacetone phosphate and glyceraldehyde-3-phosphate, and 3 cG3PDH isoforms. Antiquitin, playing a role in the detoxification of aldehydes generated by carbohydrate metabolism and lipid peroxidation, and an unidentified protein explained 78% of variability in cooking loss in castrated males. The unidentified protein loaded on the first PCA axis (65%) in the same direction as PGM1, while in a separate PCA, antiquitin loaded in the opposite direction (54%) as various ACT and MLC2 isoforms. In females, α-*b*-crystallin, which prevents aggregation of denatured proteins (Neufer & Benjamin, 1996; Thompson, Maynard, Morales, & Scordilis, 2003), and one isoform of MLC2 were strongly correlated (*r* = 0.99; *p* < 0.001). Either protein explained 33% of cooking loss in females.

For Large White sired pigs, 65% of the variability of drip loss d3 was explained by isoform M1 of pyruvate kinase (PKM1),

the last enzyme of the glycolytic pathway. This isoform charged on the first PCA axis in the same direction as 4 MLC2 isoforms and 2 actin isoforms and oppositely to two other PKM1 isoforms (Fig. 2c). For Duroc sired pigs, 34% of drip loss d3 variability was explained by one isoform of myoglobin (MB), an oxygen storage protein, which charged on the first PCA axis (37%) in the same direction as another Mb isoform and oppositely to TPI, cG3PDH, and cytoplasmic malate dehydrogenase (cMDH). cMDH allows the formation of malate from oxaloacetate. Like cG3PDH (see above), it oxidises NADH, H⁺ into NAD⁺ and is important for glycolysis (Hayes et al., 1987).

In outdoor pigs, lightness (*L*^{*}) was correlated with GP (*r* = 0.94; *p* < 0.001), and pH 45 min *post-mortem* (*r* = −0.67; *p* = 0.02) but not with ultimate pH (*r* = −0.24). In these pigs, one Mb isoform and the rearing environment-dependent (Kwasiborski et al., 2008) Heat Shock Protein 72 kDa (HSP72), a HSP70 isoform, which ensures that newly synthesised proteins are folded and function correctly and facilitate rapid recovery and remodelling if damage occurs due to stress, explained 84% of *L*^{*} variability. If included, GP was retained in the model, explaining 88% of variability. In indoor pigs, lightness was correlated with pH 45 min *post-mortem* (*r* = 0.66; *p* < 0.02), and strongly (*p* < 0.001) with redness (*r* = 0.82) and yellowness (*b*^{*}; *r* = 0.88). In these pigs, levels of an unidentified protein (spot 2104) and of Aminoacylase 1 (ACY1) explained 58% of the variability. The unidentified protein loaded on the first PCA (62%) axis in the opposite direction of various enzymes of the glycolytic pathway (2 ENO3β-isoforms, GAPDH, cG3PDH, phosphoglycerate mutase 1) and in the same direction as cytochrome Bc1 (CytBc1), a mitochondrial respiratory chain component. Aminoacylase 1 is the most abundant isoform of the aminoacylases, a class of enzymes involved in hydrolysis of *N*-acetylated proteins (Perrier, Durand, Giardina, & Puigserver, 2005; Persson, 1997; Sass et al., 2006). Aminoacylase 1 loaded on the first PCA axis (58%) in the opposite direction of various isoforms of myofibrillar constituents (MLC2, ACT, cofilin and TNT). When included in the explanatory variables, GP and ACY1 were re-

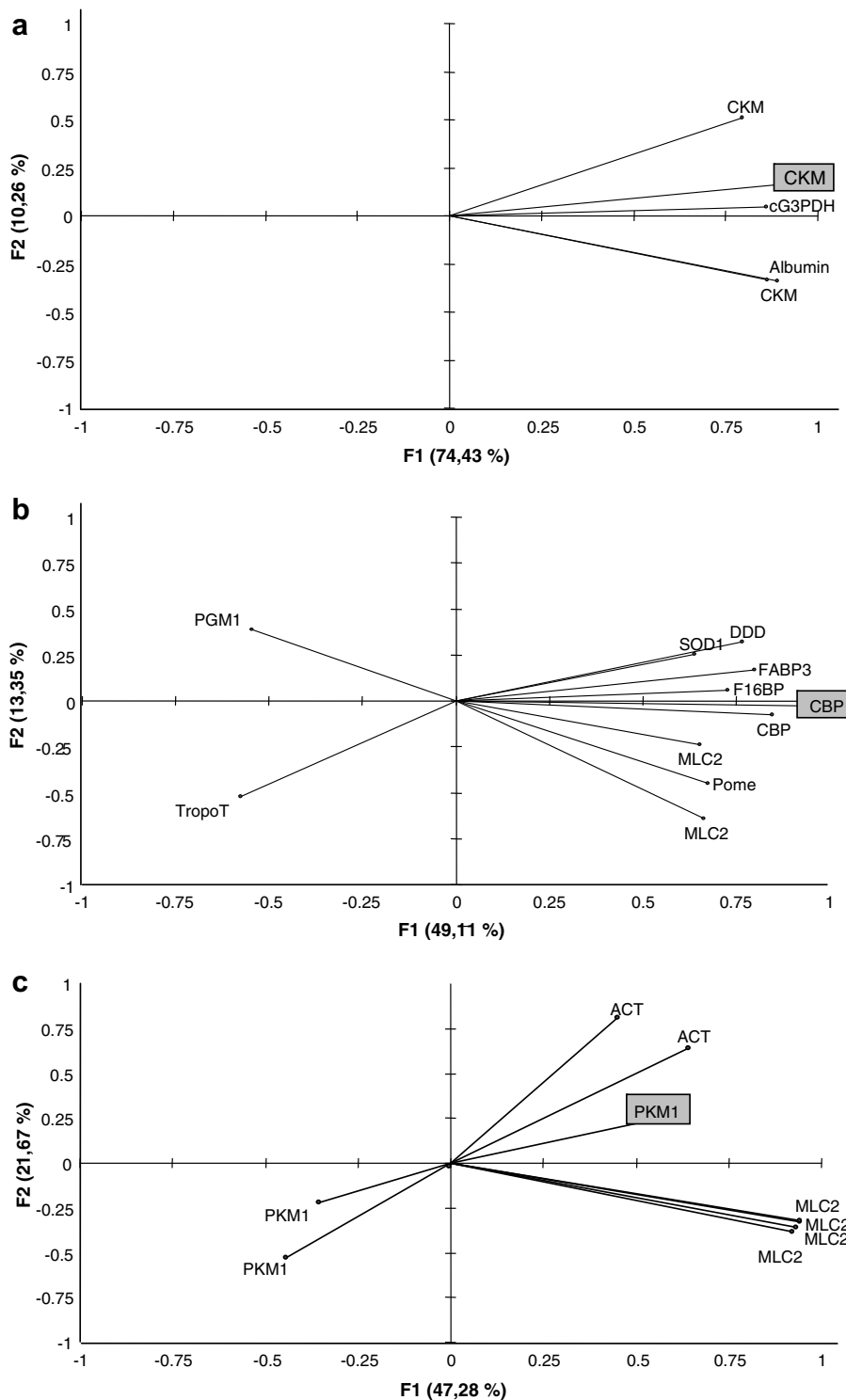


Fig. 2. Principal PCA axes showing relationships between: (a) the muscular creatine kinase (CKM) explaining 83% of ultimate pH variability in female pigs, various other CKM isoforms and cytosolic Glycerol-3-phosphate dehydrogenase; (b) Ca^{2+} Binding Protein explaining 69% of α' variability in female pigs, various myosin light chain 2 (MLC2) and isoform 1 of phosphoglycerate mutase; (c) the M1 isoform of Pyruvate Kinase (PKM1) explaining 65% of drip loss d3 variability in Large White-sired pigs, various PKM1 isoforms, Actin and MLC2. CKM, CBP and PKM1, retained in the regression model, are marked by a grey area. cG3PDH; cytosolic Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, Troponin T, SOD1; Superoxide dismutase 1, DDD; Dimeric dihydrodiol dehydrogenase, FABP3; Fatty acid binding protein isoform 3, F16BP; Fructose-1,6-Biphosphate, Pome; Proteasome, MLC2; Myosin light chain 2, ACT; Actin.

tained in the model explaining 64% of the variability, and spot 2104 was removed. GP and intensity of spot 2104 were correlated ($r = -0.64$; $p < 0.03$).

No correlations were found between proteins and yellowness (b)

Both sire breed and gender influenced thawing loss (Table 6). Explanatory models were found for each of the four subgroups. In castrated males, actin interacting protein 1 (Aip1p), a 67-kDa WD repeat protein known to enhance the depolymerisation of actin filaments in interaction with cofilin (Voegtli, Madrona, & Wil-

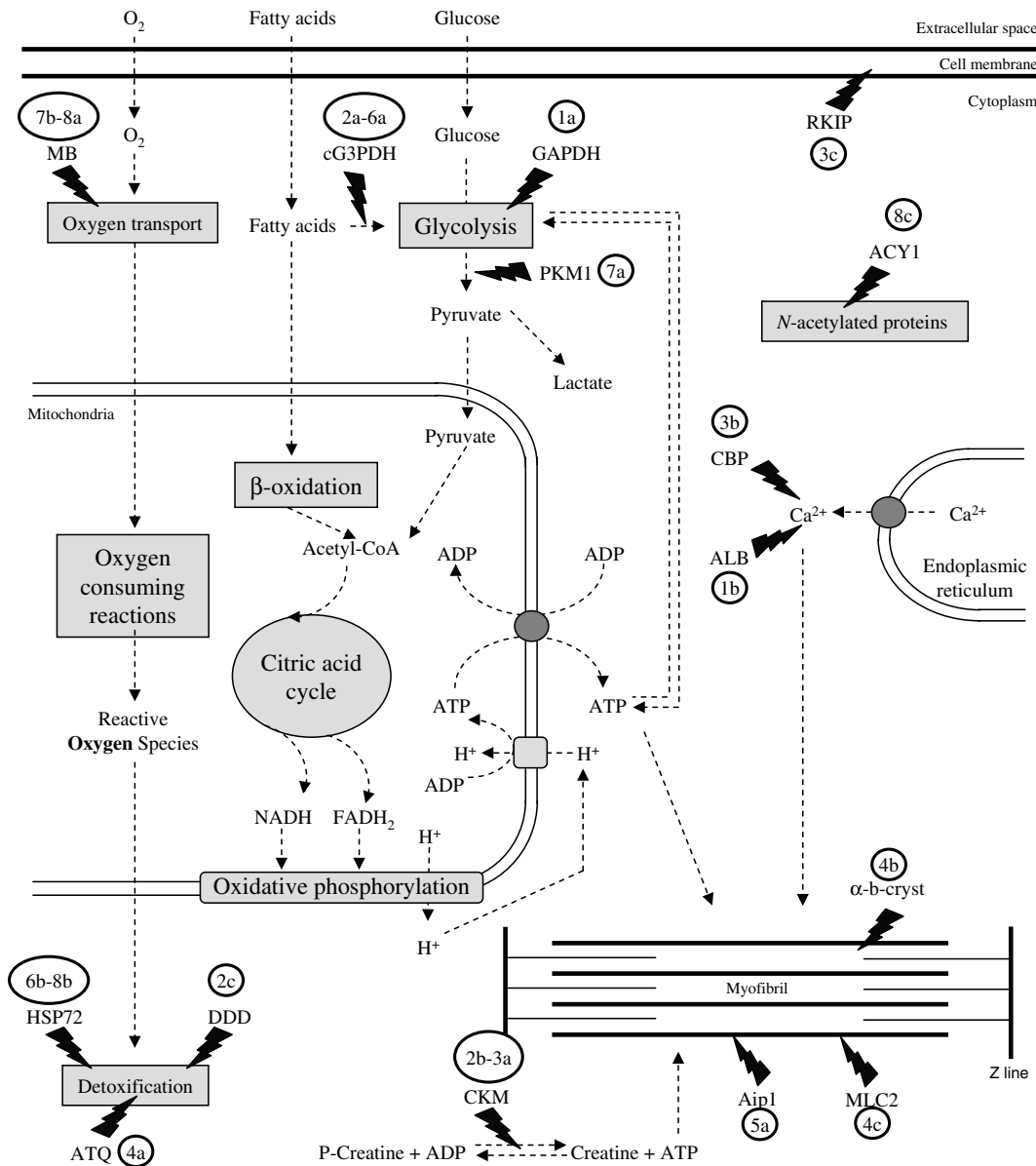


Fig. 3. Role of proteins retained by multiple regression models. 1a – glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase correlated with temperature 45 min *post-mortem* all animals confounded; 1b – albumin correlated with temperature 45 min *post-mortem* all animals confounded; 2a – cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase correlated with the ultimate pH in castrated males; 2b – muscular creatine kinase correlated with ultimate pH in females; 2c – dimeric dihydrodiol dehydrogenase correlated with ultimate pH in females; 3a – muscular creatine kinase correlated with redness in castrated males; 3b – Ca²⁺ binding protein correlated with redness in females; 3c – Raf kinase inhibitor protein correlated with redness in females; 4a – antiquitin correlated with cooking loss in castrated males; 4b – α -b-crystallin correlated with cooking loss in females; 4c – myosin light chain 2 correlated with cooking loss in females; 5a – actin interacting protein 1 correlated with thawing loss in castrated males; 6a – cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase correlated with thawing loss in Large White sired pigs; 6b – heat shock protein 72 kDa correlated with thawing loss in Duroc sired pigs; 7a – pyruvate kinase M1 correlated with drip loss at 3 days in Large White sired pigs; 7b – myoglobin correlated with drip loss at 3 days in Duroc sired pigs; 8a – myoglobin correlated with lightness in outdoors; 8b – heat shock protein 72 kDa correlated with lightness in outdoors; 8c – aminoacylase 1 correlated with lightness in indoors. Mechanisms are discussed in the Section 4.

son, 2003), was retained by the model. In accordance with this, Aip1p and cofilin levels were correlated for castrated males ($r = 0.81$; $p = 0.001$). Inclusion of ultimate pH in addition to Aip1p created a model explaining 85% of thawing loss variability. In females, an unidentified protein explained 78% of thawing loss variability. This unidentified protein loaded on the first PCA axis (34%) in the same direction as isoform 3 of fatty acid binding protein (FABP3), implicated in the fatty acid transport from the site of synthesis to the cellular membrane, CytBc1, and in the opposite direction to 2 isoforms of ENO3 β , TPI and cG3PDH. In Duroc sired pigs, thawing loss was negatively correlated to ultimate pH ($r = -0.77$, $p = 0.003$). The model retained, however, not ultimate pH but cG3PDH (negatively correlated with ultimate pH, $r = -0.65$;

$p < 0.05$) which explained 72% of thawing loss variability. For Large White sired pigs, ultimate pH was also correlated with thawing loss ($r = -0.79$; $p < 0.01$) while not retained in the model. An unidentified protein explained 78% of thawing loss variability in this group. This protein was positively correlated ($p < 0.05$) with various MLC isoforms ($r = -0.61$; $r = -0.63$), and two isoforms of tropomyosine ($r = -0.63$; $r = -0.65$), and negatively ($p < 0.01$) with 2 isoforms of ENO3 β ($r = 0.71$; $r = 0.83$) and ($p < 0.05$) an isoform of PGM1 ($r = -0.64$) and consequently loaded on the first PCA axis (57%) in the same and opposite directions.

The proportion of proteins correlated with most meat quality traits, including ultimate pH, drip loss d3, thawing loss, lightness and redness was significantly greater than 5% (Table 6).

Table 7
Biochemical mechanisms explaining the relationships between proteins retained by models, and meat quality traits

Meat quality	Subgroup	Protein retained in the model	Biochemical characteristic indicated by the protein	Biochemical mechanism explaining the relationship (whether positive or negative) with the meat quality trait
Ultimate pH	Castrated males Female	Cytosolic Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	Increased NADH, H ⁺ oxidising capacity	Total <i>post-mortem</i> energy metabolism
		Muscular creatine kinase	Increased phosphor transfer	Early <i>post-mortem</i> metabolism
a [*]	Castrated males Female	Dimeric dihydrodiol dehydrogenase	Increased presence of fast glycolytic fibre types	Total <i>post-mortem</i> energy metabolism
		Muscular creatine kinase	Increased phosphor transfer	Early <i>post-mortem</i> energy metabolism → oxidation
Cooking loss	Castrated males	Calcium binding protein	Increased anti-oxidative capacity and presence of O ₂	Oxidation
		Raf kinase inhibitor protein	Increased presence of oxygen consuming enzymes	Oxidation
		Antiquitin	Increased early <i>post-mortem</i> metabolism	Early <i>post-mortem</i> energy metabolism
		Unidentified protein	Increased presence of fast glycolytic fibre types	Total <i>post-mortem</i> energy metabolism
Thawing loss	Female	Isoform 2 of myosin light chain	Decreased early <i>post-mortem</i> metabolism	Early <i>post-mortem</i> energy metabolism
		α-β-Crystallin	Decreased early <i>post-mortem</i> metabolism	Early <i>post-mortem</i> energy metabolism
		Actin interacting protein 1	Increased depolymerisation of actin	Denatured myofibrils
		Unidentified protein	Increased lipid-oriented metabolism	Increased lipid content
Drip loss at day 3	Duroc sired	cytosolic Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	Increased NADH, H ⁺ oxidising capacity	Total <i>post-mortem</i> energy metabolism
		Unidentified protein	Decreased presence of metabolic enzymes	Early <i>post-mortem</i> energy metabolism
		Myoglobin	Decreased presence of fast glycolytic fibre types, decreased NADH, H ⁺ oxidising capacity	Total <i>post-mortem</i> energy metabolism
L [*]	Large White sired Outdoor indoor	Muscular pyruvate kinase (inactive form)	Decreased early <i>post-mortem</i> metabolism	Early <i>post-mortem</i> energy metabolism
		MYOGlobin	Decreased presence of fast glycolytic fibre types	Early <i>post-mortem</i> energy metabolism
		Heat shock protein 72 kDa	Stress-induced decrease in glycogen content	Total <i>post-mortem</i> energy metabolism
		Unidentified protein	Decreased presence of fast glycolytic fibres	Total <i>post-mortem</i> energy metabolism
		Aminoacylase 1	Increased early <i>post-mortem</i> metabolism	Early <i>post-mortem</i> energy metabolism

4. Discussion

The present study has determined protein content in the cellular soluble fraction, to compare them with longissimus meat quality traits of pigs that differed in sire breed, gender and rearing environment. Although GP did not differ between groups, glycogen content 45 min and 24 h *post-mortem*, as well as ultimate pH and thawing loss depended on sire breed, gender and rearing environment. Particularly, indoor-reared Large White sired pigs had higher glycogen content, and lower ultimate pH and more thawing losses, than indoor-reared Duroc sired pigs. In outdoor-reared pigs, these sire breed effects were not observed. In contrast to Duroc sired pigs, Large White sired pigs showed a gender effect as females had higher glycogen content, lower ultimate pH and higher thawing losses than castrated male pigs. Large White sired pigs had further increased drip loss. It is well known that muscles containing more glycogen give rise to meat with lower ultimate pH and increased drip, and at least sometimes, thawing loss (Bendall, 1973; Rammouz, Babilé, & Fernandez, 2004). Results show that GP, early *post-mortem* pH and temperature as well as ultimate pH, water holding capacity and colour were correlated with levels of various proteins. One or two proteins explained between 24% and 85% of variability in these meat quality traits. The proteins correlated with the various meat quality traits differed often between treatment groups. Relationships are interpreted below.

Although few proteins were correlated with early *post-mortem* temperature, they appeared to be of biological significance (Fig. 3). Fifty-four percent of early *post-mortem* temperature variability was explained by variability of two proteins, GAPDH and albumin, all animals confounded. Glycolysis is an exothermic reaction and determines partly *post-mortem* muscle temperature evolution (Bendall, 1973; Maribo, Olsen, Barton-Gade, Moller, & Karlsson, 1998). The positive correlation with GAPDH levels, an enzyme of the glycolytic pathway, is therefore not surprising. Animals with higher levels of GAPDH may have been more physically active *ante-mortem* or have higher proportions of muscle fibres with a predominantly glycolytic metabolism (Cuvelier, Cabaraux, Dufrasne, Istasse, & Hornick, 2005). The negative correlation between albumin and early *post-mortem* temperature may be related to a reduction in metabolic rate due to reduced intracellular calcium levels. Albumin binds calcium and facilitates its re-absorption via the sarcoplasmic reticulum ATPase pumps (Bienzle, Jacobs, & Lumsden, 1993; Chiesi & Guerini, 1987).

Explanatory models varied mostly according to gender. In the present study, castrated males had higher ultimate pH than females in accordance with many other articles (e.g. Larzul et al., 1997), although controversies remain (Fernandez & Tornberg, 1991). In castrated males, 67% of the variability in ultimate pH was explained by an isoform of cG3PDH, an enzyme that oxidises NADH, H⁺ and is important for glycolysis (Haddock & Jones, 1977; Holloszy & Booth, 1976), and thus, *post-mortem* pH decline (Fig. 3; Table 7).

In females, a CKM isoform and DDD explained 83% of ultimate pH variability. CKM levels explained the larger part of variability in ultimate pH. CKM regulates intracellular phosphocreatine/creatine and ATP/ADP ratios and is involved in the formation of ATP, resulting in the production of protons, during the early *post-mortem* stages (Bendall, 1973). Ultimate pH is determined by various factors related to initial glycogen levels and overall metabolic rate. In the present study, glycogen levels in female pigs were sufficiently high to not be a limiting factor for *post-mortem* glycolysis (Kwasiborski et al., 2008) and therefore did not contribute to individual variability. High CKM levels probably indicate increased initial *post-mortem* metabolic rate in the LL resulting in lower

ultimate pH. DDD contributed to a lesser extent to explain differences in ultimate pH. In female pigs, higher DDD levels were associated with lower levels of ENO3 β and higher levels of CBPs, MLC2s, and actin. Together, this indicates that lower DDD levels were associated with higher metabolic activity and therefore with increased *post-mortem* glycolysis-dependent production of acidity. These results show that, depending on gender, variations in ultimate pH were related to variations in different proteins. These appear to reflect variations in biochemical mechanisms known to be involved in ultimate pH levels, early and total *post-mortem* energy metabolism, although the relative contributions of these mechanisms seem to vary according to gender (Fig. 3; Table 7).

In castrated males and females, 47% and 69% of a^* were explained by protein levels. Redness (a^*) of meat depends not only on myoglobin content, but also on its biochemical form. Redness is lower at lower oxymyoglobin levels, generally associated with higher levels of oxygen-consuming enzymes (Lindahl, Henckel, Karlsson, & Andersen, 2006). Low early *post-mortem* pH denatures oxygen-consuming enzymes explaining the negative correlation between a^* and early *post-mortem* pH observed in the present and earlier studies (Lindahl et al., 2006). Lower early *post-mortem* pH resulting from faster metabolic rate may explain the relationship between increased redness and increased CKM levels and glycogen content, in castrated males (Fig. 3; Table 7). The increased a^* in muscles of females with higher CBP levels (associated with increased MLC2 and decreased fast troponin T levels), indicative of decreased energy metabolic activity, is however contrary to the expected results. The positive relationship between a^* and CBP levels is possibly explained by the associated increased levels of SOD1. This enzyme catalyses the dismutation of superoxide (O_2^-) to O_2 and H_2O_2 and could thus increase formation of oxymyoglobin, thus increasing redness. Increased levels of RKIP were associated with higher levels of oxygen-consuming enzymes related to lipid metabolism (cG3PDH and TPI). Increased levels of oxygen-consuming enzymes reduce oxygen availability, and consequently Mb oxygenation, leading to lower a^* values (Lindahl et al., 2006). Thus, variations in redness were related with variations in different proteins that appear to express, depending on gender, directly or indirectly, *post-mortem* oxidative rate (Fig. 3; Table 7).

In castrated males, cooking loss was positively related to levels of antiquitin and an unidentified protein, explaining 78% of variability. Increased levels of the unidentified protein appeared to reflect the increased presence of fast glycolytic muscle fibre types as indicated by its association with higher levels of PGM1. Increased antiquitin levels apparently reflected increased metabolic activity, as indicated by lower MLC2 levels. In female pigs, cooking loss was higher in muscles with lower early *post-mortem* metabolic activity (indicated by higher MLC2/ α -*b*-crystallin levels). The relationships between fibre type and/or metabolic activity and water holding capacity during cooking is probably indirect (Laville et al., 2007). These results indicate that in both genders, cooking loss depended on early *post-mortem* energy metabolism. In castrated males, total energy metabolism explains additional variability (Fig. 3; Table 7).

In castrated males and females, the models explained 85% and 78% of thawing loss variability, respectively. In castrated males, lower ultimate pH was associated with increased thawing loss, as earlier found for turkeys by Rammouz et al. (2004). Water holding capacity depends much on the amount of water entrapped in protein structures, mainly myofibrillar (Huff-Lonergan & Lonergan, 2005). Consequently, denaturation of myofibrillar proteins decreases water-holding capacity (Penny, 1969). The effect of pH on denaturation of myofibrillar proteins is well known (Huff-Lonergan & Lonergan, 2005). Similarly, the additional effect of Aip1p on thawing loss in meat of castrated males may be explained by its depolymerising action on actin (Voegtli et al., 2003), possibly in interaction with the effects of freezing and thawing (Fig. 3; Table 7).

In females, reduced thawing loss was associated with higher levels of an unidentified protein. This protein probably reflected a more lipid-oriented metabolism, as suggested by its association with FABP3 and CytBc1 (Kwasiborski et al., 2008), and by its negative correlations with four glycolytic enzymes. In accordance with these results, thawing loss was earlier found to be lower in meat with high fat content (Heyer, Andersson, Rydhmer, & Lundström, 2004; Fig. 3; Table 7).

As sire breed also influenced thawing loss, models were created according to this treatment factor. Nearly the same percentage of variability in thawing loss could be explained in models based on the two sire breeds. Models explained 72% and 85% of thawing loss variability in Duroc and Large White sired pigs, respectively. The positive correlation between thawing loss and cG3PDH in Duroc sired pigs is explained by variations in ultimate pH, which was negatively correlated with cG3PDH and thawing loss. cG3PDH levels are higher in muscle fibres with glycolytic activity (Harrison, Latorre, & Dauncey, 1997) which due to their increased glycogen content generally give rise to meat with lower ultimate pH (Laborde, Talmant, & Monin, 1985; Larzul et al., 1997; Monin, Mejeunes-Quijano, Talmant, & Sellier, 1987; Fig. 3; Table 7).

Lower levels of an unidentified protein were related to higher thawing losses in Large White sired pigs, probably because they reflect increased early *post-mortem* metabolic activity in the muscle cell. Lower levels of this protein were correlated with higher levels of various metabolic enzymes and with lower levels of myofibrillar proteins, indicative of higher early *post-mortem* metabolic activity. (Kwasiborski et al., 2008). Higher early *post-mortem* metabolic activity facilitates protein denaturation (Huff-Lonergan & Lonergan, 2005), possibly increasing water losses at thawing. Thawing loss was the only meat quality trait for which models of different treatment groups appeared to be related to different biochemical mechanisms. While in Large White and Duroc sired pigs early and total *post-mortem* metabolism, respectively, explained variations in thawing loss, in female and castrated male pigs, these appeared to be related to lipid content and denaturation of myofibrils (Fig. 3; Table 7).

In Duroc sired pigs, 34% of variability in drip loss d3 could be explained by myoglobin levels. Differences in fibre type composition and consequences for ultimate pH appear to underlie this relationship. The porcine LL muscle contains approximately 17%, 8% and 75% of I, IIA and IIB/IIX fibres, respectively (Oksbjerg et al., 2000). Myoglobin levels are higher in the slow oxidative type of fibres (James, 1968) and in the present study, myoglobin levels were loaded in the opposite direction as various enzymes of the glycolytic pathway in the principal component analysis, including cG3PDH and cMDH, both NADH, H⁺ oxidising enzymes. Ultimate pH is often lower in muscles with a glycolytic oriented metabolism (Laborde et al., 1985; Larzul et al., 1997; Monin et al., 1987), generally leading to increased drip loss d3 (Huff-Lonergan & Lonergan, 2005). In addition, increased levels of cMDH and cG3PDH, associated with lower Mb levels, are expected to increase glycolysis and consequently, pH decline. Thus, Duroc LL muscles containing less myoglobin contained less slow oxidative fibres and more NADH, H⁺ oxidises enzymes, had lower ultimate pH and consequently more drip loss d3 (Fig. 3; Table 7), as also confirmed by the negative correlation between drip loss d3 and ultimate pH (data not shown).

For Large White sired pigs, 65% of the variability in drip loss d3 was explained by abundance of a PKM1 isoform. Different isoforms of proteins with similar chemical identifications and MW but different pI may present different functional properties (Hamelin et al., 2006). The PKM1 isoform is probably the inactive form of pyruvate kinase, suggested by its negative relationship with two other PKM1 isoforms and its positive relationship with several MLC2 isoforms. As suggested by Kwasiborski et al. (2008), amount of extracted myosin may inversely reflect intracellular ATP and

Ca²⁺ levels, indicating that the PKM1 isoform correlated with drip loss d3 in Large White sired pigs was less abundant in muscles with higher metabolic activity. This suggests that, similarly to thawing loss, in Large White sired pigs, drip loss d3 depended to a large extent on metabolic activity in the early *post-mortem* stages, while in Duroc sired pigs it depended mostly on total *post-mortem* energy metabolism (Fig. 3; Table 7).

Compared to gender and sire breed, rearing environment had much less influence on explanatory models. Myoglobin and HSP72 levels explained 84% of lightness variability in outdoor pigs. These correlations were explained by variations in estimated pre-slaughter glycogen levels (GP) and early *post-mortem* pH. Our data indicate that in outdoor pigs, muscle was lighter when GP was high and early *post-mortem* pH low. Increased myoglobin levels are indicative of increased proportions of red fibres, in which early pH decline may occur more slowly (Klont, Brocks, & Eikelenboom, 1998). Similarly, basal levels of HSP72 are higher in slow oxidative fibres (Locke, Noble, & Atkinson, 1991). Possibly more relevant in the present context, HSP72 is the stress-inducible HSP70 isoform (Craig, Ingolia, & Manseau, 1983; Johnson & Fleshner, 2006; Sorger & Pelham, 1987) and thus, higher levels probably reflect increased pre-slaughter stress levels (Hernando & Manso, 1997) that cause glycogen breakdown and limit total pH decline (Terlouw & Rybarczyk, 2008; Fig. 3; Table 7).

In indoor pigs, 58% of variability in lightness was explained by an unidentified protein and Aminoacylase 1. Higher levels of the unidentified protein appeared to be indicative of increased presence of oxidative muscle fibre types, as it was positively correlated with mitochondrial CytBc1 and negatively with enzymes of the glycolytic pathway, and GP. Inclusion of GP in the regression model for *L** removed the unidentified protein, in accordance with this hypothesis. Compared to glycolytic, oxidative fibres have a lower glycogen content generally resulting in slightly higher ultimate pH and higher *L** values (Laborde et al., 1985; Larzul et al., 1997; Monin et al., 1987). The effects of early *post-mortem* pH on *L** are indicated by the negative correlation between *L** and ACY1. Lower levels of ACY1 were associated with higher levels of myofibrillar proteins, indicative of lower early *post-mortem* metabolic activity (Kwasiborski et al., 2008), generally resulting in higher *L** values (Lindahl et al., 2006). Thus, models for indoor and outdoor pigs show that variations in *L** value were partly related to variations in early and total *post-mortem* metabolism, in accordance with existing knowledge (Fig. 3; Table 7).

In conclusion, the present study found that 1 or 2 proteins, often related to biochemical pathways known to be involved in *post-mortem* muscle processes, explained between 24% and 85% of variability in meat quality traits. Models differed between treatment groups, but could often be interpreted in terms of common underlying mechanisms (Table 7). Thus, proteins retained in models for ultimate pH, lightness, drip, thawing and cooking loss were related to the glycolytic pathway, phosphate transfer, or fibre type composition. Another model for thawing loss retained proteins related to denaturation of myofibrils or lipid content. The models for redness involved proteins related to *post-mortem* oxidative activity. These results show that proteins correlated with meat quality traits are related to biochemical mechanisms known to be involved in meat quality, although the relative contributions of these mechanisms may vary according to gender, sire breed or rearing environment. Results may be a first step towards a better understanding of underlying cellular mechanisms responsible for rearing environment and genetic effects on *post-mortem* muscle processes.

Acknowledgements

The present study has been financed by INRA (France) and Genus Plc (USA). The authors thank Elisabeth Laville and two anon-

ymous referees for helpful comments on an earlier version of this paper.

References

- Aoki, S., Ishikura, S., Asada, Y., Usama, N., & Hara, A. (2001). Identity of dimeric dihydrodiol dehydrogenase as NADP⁺-dependent D-xylulose dehydrogenase in pig liver. *Chemico-Biological Interactions*, 130, 775–784.
- Arimitsu, E., Aoki, S., Ishikura, S., Nakanishi, K., Matsuura, K., & Hara, A. (1999). Cloning and sequencing of the cDNA species for mammalian dimeric dihydrodiol dehydrogenases. *Biochemical Journal*, 342, 721–728.
- Bendall, J. R. (1973). Post-mortem changes in muscle. In G. H. Bourne (Ed.), *Structure and function of muscle* (2nd ed., pp. 244–309). New York, NY: Academic Press.
- Bergmeyer, H. U. (1974). *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie Weinheim, 2196(3), 1196–1201.
- Bienzle, D., Jacobs, R. M., & Lumsden, J. H. (1993). Relationship of serum total calcium and serum albumin in dogs, cats, horses and cattle. *Canadian Veterinary Journal*, 34, 360–364.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Butterfield, D. A., Koppal, T., Howard, B., Subramaniam, R., Hall, N., Hensley, K., et al. (1998). Structural and functional changes in proteins induced by free radical-mediated oxidative stress and protective action of the antioxidants *N*-tert-butyl-(alpha)-phenylnitron and vitamin E. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854(1), 448–462.
- Chiesi, M., & Guerini, D. (1987). Characterization of heart cytosolic proteins capable of modulating calcium uptake by the sarcoplasmic reticulum. 1. Isolation of a protein with protective activity and its identification as muscle albumin. *European Journal of Biochemistry*, 162, 365–370.
- Craig, E. A., Ingolia, T. D., & Manseau, L. J. (1983). Expression of Drosophila heat-shock cognate genes during heat shock and development. *Developmental Biology*, 99(2), 418–426.
- Cuvelier, C., Cabaraux, J.-F., Dufrasne, I., Istasse, L., & Hornick, J.-L. (2005). Acide gras et métabolisme énergétique des muscles squelettiques chez le bovin. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 149, 188–201.
- Fernandez, X., & Tornberg, E. (1991). A review of the causes of variation in muscle glycogen content and ultimate pH in pigs. *Journal of Muscle Foods*, 2, 209–235.
- Gentry, J.-G., Mc Glone, J.-J., Miller, M.-F., & Blanton, J.-R. (2004). Environmental effects on pigs performance, meat quality and muscle characteristics. *Journal of Animal Science*, 82, 209–217.
- Haddock, B. A., & Jones, C. W. (1977). Bacterial respiration. *Bacteriological Reviews*, 41(1), 47–99.
- Hagan, S., Garcia, R., Dhillon, A., & Kolch, W. (2006). Raf kinase inhibitor protein regulation of Raf and MAPK signalling. In C. J. D. a. A. H. William E. Balch (Ed.), *Methods in enzymology: Regulators and effectors of small gtpases: Ras family* (pp. 248–259). Academic Press.
- Hamelin, M., Sayd, T., Chambon, C., Bouix, J., Bibé, B., Milenkovic, D., et al. (2006). Proteomic analysis of ovine muscle hypertrophy. *Journal of Animal Science*, 84, 3266–3276.
- Harrison, A. P., Latorre, R., & Dauncey, M. J. (1997). Postnatal development and differentiation of myofibres in functionally diverse porcine skeletal muscles. *Reproduction Fertility and Development*, 9(7), 731–740.
- Hayes, D. J., Taylor, D. J., Bore, P. J., Hilton-Jones, D., Arnold, D. L., Squier, M. V., et al. (1987). An unusual metabolic myopathy: A malate-aspartate shuttle defect. *Journal of the Neurological Sciences*, 82, 27–39.
- Hernando, R., & Manso, R. (1997). Muscle fibre stress in response to exercise: Synthesis, accumulation and isoform transitions of 70-kDa heat-shock proteins. *European Journal of Biochemistry*, 243, 460–467.
- Heyer, A., Andersson, H. K., Rydhmer, L., & Lundström, K. (2004). Carcass quality and technological and sensory meat quality of once bred gilts in a seasonal outdoor rearing system. *Acta Agricultura Scandinavica Section A – Animal Science*, 54, 103–111.
- Holloszy, J. O., & Booth, F. W. (1976). Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. *Annual Review of Physiology*, 38, 273–291.
- Honikel, K. O. (1998). Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Science*, 49, 447–457.
- Huff-Lonergan, E., & Lonergan, S. M. (2005). Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of post-mortem biochemical and structural changes. *Meat Science*, 71, 194–204.
- Hwang, I. H., Park, B. Y., Cho, S. H., Kim, J. H., Choi, Y. S., & Lee, J. M. (2004). Identification of muscle proteins related to objective meat quality in Korean native black pig. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 17(11), 1599–1607.
- James, N. T. (1968). Histochemical demonstration of myoglobin in skeletal muscle fibres and muscle spindles. *Nature*, 219, 1174–1175.
- Johnson, J. D., & Fleshner, M. (2006). Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. *Journal of Leukocyte Biology*, 79(3), 425–434. doi:10.1189/jlb.0905523.
- Keller, E. T., Fu, Z., & Brennan, M. (2004). The role of Raf kinase inhibitor protein (RKIP) in health and disease: Proceedings from the 6th and 7th international conferences, Signal Transduction 2004 and Chromatin 2004. *Biochemical Pharmacology*, 68(6), 1049–1053.

- Klont, R. E., Brocks, L., & Eikelenboom, G. (1998). Muscle fibre type and meat quality. *Meat Science*, 49, S219–S229.
- Kwasiborski, A., Sayd, T., Chambon, C., Santé-Lhoutellier, V., Rocha, D., & Terlouw, C. (2008). Pig *Longissimus lumborum* proteome: Part I: Effects of genetic background, rearing environment and gender. *Meat Science*, doi:10.1016/j.meatsci.2008.04.028.
- Laborde, D., Talmant, A., & Monin, G. (1985). Activités enzymatiques métaboliques et contractiles de 30 muscles du porc. Relations avec le pH ultime atteint après la mort. *Reproduction Nutrition Development*, 25, 619–628.
- Larzul, C., Lefaucheur, L., Ecolan, P., Gogue, J., Talmant, A., Sellier, P., et al. (1997). Phenotypic and genetic parameters for longissimus muscle fiber characteristics in relation to growth, carcass, and meat quality traits in large white pigs. *Journal of Animal Science*, 75(12), 3126–3137.
- Laville, E., Sayd, T., Terlouw, C., Chambon, C., Damon, M., Larzul, C., et al. (2007). Comparison of sarcoplasmic proteomes between two groups of pig muscles selected for shear force of cooked meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5834–5841.
- Lindahl, G., Henckel, P., Karlsson, A. H., & Andersen, H. J. (2006). Significance of early post-mortem temperature and pH decline on colour characteristics of pork loin from different crossbreeds. *Meat Science*, 72, 613–623.
- Locke, M., Noble, E. G., & Atkinson, B. G. (1991). Inducible isoform of HSP70 is constitutively expressed in a muscle fiber type specific pattern. *American Journal of Physiology*, 261, C774–C779.
- Maddock, K. R., Huff-Lonergan, E., Rowe, L. J., & Lonergan, S. M. (2005). Effect of pH and ionic strength on mu- and m-calpain inhibition by calpastatin. *Journal of Animal Science*, 83(6), 1370–1376.
- Maribo, H., Olsen, E. V., Barton-Gade, P., Moller, A. J., & Karlsson, A. (1998). Effect of early post-mortem cooling temperature, pH fall and meat quality in pigs. *Meat Science*, 50(1), 115–129.
- Mercier, Y., Gatellier, P., & Renner, M. (2004). Lipid and protein oxidation in vitro, and antioxidant potential in meat from Charolais cows finished on pasture or mixed diet. *Meat Science*, 66(2), 467–473.
- Meunier, B., Bouley, J., Picot, I., Bernard, C., Picard, B., & Hocquette, J.-F. (2005). Data analysis methods for detection of differential protein expression in two-dimensional gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 340, 226–230.
- Monin, G., Mejenes-Quijano, A., Talmant, A., & Sellier, P. (1987). Influence of breed and muscle metabolic type on muscle glycolytic potential and meat pH in pigs. *Meat Science*, 20, 149–158.
- Monin, G., & Sellier, P. (1985). Pork of low technological quality with a normal rate of pH fall in the immediate post-mortem period: The case of the Hampshire breed. *Meat Science*, 13, 49–63.
- Morcuende, D., Estevez, M., Ruiz, J., & Cava, R. (2003). Oxidative and lipolytic deterioration of different muscles from free-range reared Iberian pigs under refrigerated storage. *Meat Science*, 65(3), 1157–1164.
- Morzel, M., Chambon, C., Hamelin, M., Santé-Lhoutellier, V., Sayd, T., & Monin, G. (2004). Proteome changes during pork meat ageing following use two different pre-slaughter handling procedures. *Meat Science*, 67, 689–696.
- Morzel, M., Terlouw, C., Chambon, C., Micol, D., & 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, 297–304.
- Neufer, P. D., & Benjamin, I. J. (1996). Differential expression of alpha-b-crystallin and HSP27 in skeletal muscle during continuous contractile activity. *Journal of Biological Chemistry*, 271(39), 24089–24095.
- Offer, G., & Cousins, T. (1992). The mechanism of drip production: Formation of two compartments of extracellular space in muscle post-mortem. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 58, 107–116.
- Oksbjerg, N., Petersen, J. S., Sorensen, I. L., Henckel, P., Vestergaard, M., Ertbjerg, P., et al. (2000). Long-term changes in performance and meat quality of Danish Landrace pigs: A study on a current compared with an unimproved genotype. *Animal Science*, 71, 81–92.
- PDQuest User Guide for Version 7.1 (2002). Bio-Rad Laboratories.
- Penny, F. (1969). Protein denaturation and water-holding capacity in pork muscle. *International Journal of Food Science and Technology*, 4(3), 269–273.
- Perrier, J., Durand, A., Giardina, T., & Puigserver, A. (2005). Catabolism of intracellular N-terminal acetylated proteins: Involvement of acylpeptide hydrolase and acylase. *Biochimie*, 87(8), 673–685.
- Persson, S. G. B. (1997). Heart rate and blood lactate responses to submaximal treadmill exercise in the normally performing standardbred trotter – Age and sex variations and predictability from the total red blood cell volume. *Journal of Veterinary Medicine Series A – Zentralblatt Fur Veterinarmedizin Reihe A – Physiology Pathology Clinical Medicine*, 44(3), 125–132.
- Rammouz, R., Babilé, R., & Fernandez, X. (2004). Effect of ultimate pH on the physicochemical and biochemical characteristics of turkey breast muscle showing normal rate of post-mortem pH fall. *Poultry Science*, 83, 1750–1757.
- Renner, M. (1990). Reviews: Factors involved in the discoloration of beef meat. *International Journal of Food Science and Technology*, 25, 613–630.
- Renner, M., Dumont, F., & Gatellier, P. (1996). Antioxidant enzyme activities in beef in relation to oxidation of lipid and myoglobin. *Meat Science*, 43(2), 111–121.
- Rosenvold, K., & Andersen, H. J. (2003). Factors of significance for pork quality. A review. *Meat Science*, 64, 219–237.
- Rowe, L. J., Maddock, K. R., Lonergan, S. M., & Huff-Lonergan, E. (2004). Oxidative environments decrease tenderization of beef steaks through inactivation of mu-calpain. *Journal of Animal Science*, 82, 3254–3266.
- Sass, J., Mohr, V., Olbrich, H., Engelke, U., Horvath, J., Fliegau, M., et al. (2006). Mutations in ACY1, the gene encoding aminoacylase 1, cause a novel inborn error of metabolism. *American Journal of Human Genetics*, 78(3), 401–409.
- Sayd, T., Morzel, M., Chambon, C., Franck, M., Figwer, P., Larzul, C., et al. (2006). Proteome analysis of the sarcoplasmic fraction of pig Semimembranosus muscle: Implication on meat color development. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54, 2732–2737.
- Sorger, P. K., & Pelham, H. R. (1987). Cloning and expression of a gene encoding hsc73, the major hsp70-like protein in unstressed rat cells. *EMBO Journal*, 6, 993–998.
- Taylor, R. G., Tassy, C., Briand, M., Robert, N., Briand, Y., & Ouali, A. (1995). Proteolytic activity of proteasome on myofibrillar structures. *Molecular Biology Reports*, 21(1), 71–73.
- Terlouw, E.M.C., & Rybarczyk, P. (2008). Explaining and predicting differences in meat quality through stress reactions at slaughter: The case of Large White and Duroc pigs. *Meat Science*, doi:10.1016/j.meatsci.2007.11.013.
- Thompson, H. S., Maynard, E. B., Morales, E. R., & Scordilis, S. P. (2003). Exercise-induced HSP27, HSP70 and MAPK responses in human skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica*, 178, 61–72.
- Voegtli, W. C., Madrona, A. Y., & Wilson, D. K. (2003). The structure of Aip1p, a WD repeat protein that regulates cofilin-mediated actin depolymerization. *Journal of Biology Chemistry*, 278(36), 34373–34379.
- Zelko, I. N., Thomas, T. J., & Folz, R. J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(3), 337–349.

CHAPITRE 3

Specific proteins allow classification of pigs according to sire breed, rearing environment and gender.

1 **Specific proteins allow classification of pigs according to sire breed, rearing**
2 **environment and gender.**

3
4 Anthony Kwasiborski^a, Thierry Sayd^a, Christophe Chambon^a, Véronique Santé-Lhoutellier^a,
5 Dominique Rocha^b, Claudia Terlouw^{a*}.
6
7
8

9 ^a UR370 Qualité des Produits Animaux, INRA, F-63122 St Genès Champanelle, France

10 ^b Genus plc, Genus Cambridge Research Laboratory, Department of Pathology, University of
11 Cambridge, CB2 1QP Cambridge, United Kingdom.
12
13
14
15
16
17
18

19 Corresponding author's present address:

20 Claudia Terlouw,
21 INRA, UR1213 Herbivores,
22 F-63122 Saint-Genès Champanelle, France
23 Tel : +33 (0) 473 62 45 69 / Fax : +33 (0) 473 62 41 18
24 E-mail : Claudia.Terlouw@clermont.inra.fr
25
26

27 Dominique Rocha present address:

28 UMR1061 ; INRA-Université de Limoges
29 Faculté des Sciences et Techniques
30 123, Avenue Albert Thomas
31 87060 Limoges, France

32

33 **ABSTRACT**

34

35 The present study used a proteomic data set obtained from a 2 x 2 x 2 factorial experiment on
36 *longissimus* muscle of 24 pigs to identify single or couples of proteins allowing correct classification
37 of pigs according to gender, sire breed, or rearing environment. An actin isoform, a myosin light chain
38 2 isoform and cytochrome Bc1 allowed each, correct classification of all pigs according to gender.
39 Peroxiredoxin 6 allowed correct classification of 23 pigs according to indoor or outdoor rearing
40 environment, but only if gender was also taken into account. Heat shock protein 73 allowed correct
41 classification of 21 pigs according to sire breed, Duroc or Large White. Results show that proteins
42 may be used as biomarkers for traceability or genetic research. Relationships between treatment
43 factors and intracellular regulatory mechanisms associated with these proteins are discussed.

44

45

46

47 **Keywords**

48 Proteomics, traceability, *Longissimus* muscle, pigs, heat shock proteins, myofibrillar proteins,
49 peroxiredoxin 6

50 INTRODUCTION

51

52 Proteomic techniques couple bi-dimensional electrophoresis with mass spectrometry to semi-
53 quantify usually several hundred soluble cellular proteins extracted from a chosen biological tissue. In
54 meat science, proteomics are a promising technique to increase our knowledge of factors controlling
55 muscle development, growth, and function, as well as ante and post-mortem muscle metabolism and
56 meat quality (Bouley et al., 2004; Bendixen, 2005; Lametsch et al., 2006). For example, proteomic
57 analyses of pork and beef have identified proteins that characterise muscles according to their fibre
58 composition and those that change post-mortem during ageing (Morzel et al., 2004; Jia et al., 2006;
59 Okumura et al., 2006; Hamelin et al., 2007; Morzel et al., 2007). Proteomic studies identified proteins
60 of which levels differed according to technological meat quality, including colour, drip loss, and shear
61 force (Hwang et al., 2004; Sayd et al., 2006; Laville et al., 2007; Kwasiborski et al., 2008 b). A study
62 using sensory analysis found that over 90% of variability in beef tenderness was explained by early
63 post-mortem variations in heat shock proteins (Morzel et al., 2007). They may further assist research
64 on the genetic bases of phenotypic differences in food animals. Proteomic profiling identified cellular
65 mechanisms associated with the double muscle trait in the Longissimus of Texel sheep, including up-
66 regulation of certain heat-shock proteins and of enzymes of the glycolytic and oxidative metabolic
67 pathways (Hamelin et al., 2006). Similarly, transcription profiling, involving semi-quantification of a
68 large fraction of mRNA present in the cell, was used by Sudre et al. (2005), to detect differences in
69 gene expression underlying differences in growth potential in Charolais bulls. Using the classical
70 approaches described above, we have demonstrated differences in proteomic profiles of pig
71 *Longissimus lumborum* (LL) muscle differing in sire breed, gender, and rearing environment
72 (Kwasiborski et al., 2008 a).

73 Proteomic profiles, like metabolomic and transcriptomic profiles, have other interesting
74 applications. Many medical studies have shown that they can be used for classification, most often to
75 allow early clinical diagnoses or cancer prognosis, or as biomarkers to detect specific pathologies
76 (Yang et al., 2004; Azad et al., 2006; Bouamrami et al., 2006; Ueda et al., 2008). The present study
77 evaluated if such an approach can be used in the context of agricultural research. It determined,
78 therefore, whether levels of single or couples of proteins of the proteomic profile allowed correct
79 classification of pigs according to sire breed, rearing environment and gender. Its objective was to
80 suggest new itineraries for future research on relationships between phenotypic and genetic
81 characteristics, and underlying cellular regulatory mechanisms. Specifically, where relationships
82 between protein levels and phenotypic/genetic characteristics of animals are discovered, it would be of
83 interest to subsequently study the biological causes of this relationship. Its objective was further to
84 determine whether certain proteins may be candidates for markers for traceability purposes. DNA
85 markers are more limited in their use (only applicable to confirm genetic types), and generally more
86 expensive, compared to the determination of protein levels.

87 **MATERIALS AND METHODS.**

88

89 1- Animals, housing and slaughter

90

91 Experimental procedures and animal holding facilities respected French animal protection
92 legislation, including licensing of experimenters. Experimental conditions were controlled and
93 approved by the French Veterinary Services. Ten Large White x Landrace sows were inseminated
94 with mixed semen from PIC Duroc and Large White sires. From the about 100 piglets, 48 median
95 weight piglets have been selected, based on motherhood (similar numbers of piglets per dam) and sire
96 breed (24 Duroc and 24 Large White-sired piglets). Pigs were born on the site in an outdoor farrowing
97 system. They were weaned at 4 weeks and kept indoors until fattening at 2 months of age. Half of each
98 genetic type was fattened indoors in four 2.2 x 2.9 m pens with slatted floors in a heated and ventilated
99 animal room of 4 x 8.8 m. The other half was fattened outdoors on 850 m² parcels with little grass.
100 Each parcel contained a 7.5 m² hut, a trough, a bowl drinker and a mud hole with water (pool). There
101 were 6 pigs (3 females, 3 castrated males) of a single genetic type to a pen or parcel. Pigs were put
102 into the fattening system in April and slaughtered in October. Outdoor pigs were fed *ad libitum*, indoor
103 pigs were slightly restricted in order to standardise slaughter weight at similar ages. The same
104 liquefied food preparation was distributed to indoor and outdoor pigs, at 6 and 18 h.

105 Pigs were slaughtered at the age of about 8 months in a small local abattoir after a fasting period of
106 24 hours. Half of each treatment group was slaughtered after mixing, short transport, and overnight
107 lairage and half immediately following a short transport. Slaughter took place on two different days, at
108 one-week interval, balanced for housing system, genetic type, gender and slaughter conditions.

109 They were stunned on the floor with manually operated low voltage tongs. Five minutes after
110 exsanguination, a 5-g sample of the *Longissimus lumborum* was excised, introduced into a plastic cup
111 and immediately frozen in liquid nitrogen. Upon arrival at the laboratory, the cups were stored at -80
112 °C until its use for the proteomic study. Forty-five min after exsanguination, 1-g and 2-g samples were
113 obtained from the same muscle. The 1-g samples were immediately frozen in liquid nitrogen and
114 subsequently stored at -80°C for later assaying of lactate and glycogen contents. The 2-g samples were
115 immediately homogenised (Polytron Kinematica, Luzern, Switzerland, 20 s, 22 000 rt/min) in 18 ml of
116 5 mM iodoacetate to measure pH. Twenty-four hours after slaughter, pH was measured directly in an
117 incision in the *Longissimus lumborum*. In both cases, pH was measured with a glass electrode (Inlab
118 427, Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland) connected to a portable pH-meter (Schött-Geräte,
119 Germany) directly in the muscle.

120 To measure glycogen and lactic acid contents, about 200 mg of lyophilised muscle was ground and
121 suspended in 10 ml of perchloric acid 0.5 M. After hydrolysis of the glycogen by amyloglucosidase
122 (Bergmeyer, 1974), glucose content of the homogenate was determined. Lactic acid was determined
123 on the supernatant after centrifugation (20 min at 2500 g) of the perchloric homogenate following

124 Bergmeyer's (1974) procedure. Glycolytic potential, the sum of compounds likely to produce lactic
125 acid post-mortem, was calculated using the formula proposed by Monin and Sellier (1985).
126 Concentrations are expressed as μmol lactate equivalents/g of fresh tissue.
127 Only 24 pigs were used for the proteomic analysis. Pigs were selected according to their glycolytic
128 potential and ultimate pH both considered reliable technological meat quality indicators. Castrated
129 males and females were represented with different symbols in a scatter plot (ultimate pH vs glycolytic
130 potential: $r=-0.60$, $p<0.0001$) and the 3 higher and 3 lower values were selected for each genetic type
131 and each rearing system, while balancing for gender. Thus, if for a given genetic type and rearing
132 system, 2 higher and one lower values were selected for castrated male pigs and one higher and 2
133 lower values were selected for female pigs, the reverse was done for the other genetic type and rearing
134 system. (Kwasiborski et al., 2008a). This procedure resulted in the selection of 10 pigs that were
135 mixed and lairaged before slaughter, and 14 that were slaughtered immediately following transport.

136

137 2- Proteomic study

138

139 *Sarcoplasmic protein extraction, 2-dimensional electrophoresis and image analysis.*

140 Protein extraction, electrophoresis and image analysis were carried out according to the procedure
141 described by Sayd et al. (2006). Frozen muscle was homogenised at 4 °C using a glass bead agitator
142 (Retsch, Haan, Germany) in a buffer made of 40mM Tris HCl (pH 8.8), 2mM EDTA, and a protease
143 inhibitor cocktail. The homogenate was centrifuged (4 °C, 10 min, 10000 g) and the supernatant,
144 referred to as the sarcoplasmic extract, was stored at -80 °C. The protein content was determined using
145 the Bradford method (Bradford, 1976).

146 For electrophoresis, 900 μg of sarcoplasmic proteins suspended in a 7 M urea, 2 M thiourea and
147 2% CHAPS buffer were loaded onto immobilised pH gradient strips (pH 5-8, Biorad, Hercules, USA).
148 Isoelectric focusing was performed using a Protean IEF cell system (Biorad). Strips were passively
149 rehydrated for 16 h before application of rapid voltage ramping to reach a total of 85 kVh. For the
150 second dimension, proteins were separated on 12% sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel
151 electrophoresis (SDS-PAGE) gels using Protean II XL system (Biorad). Gels were Coomassie Blue
152 stained. They were produced in triplicate, resulting in the production of 72 gels.

153 Gels were scanned and analysed using the two-dimensional electrophoresis image analysis
154 software PDQuest (Biorad). Each detected and matched spot was normalised by expressing its relative
155 quantity relative to the total quantity of valid spots, in ppm. For one sample and one spot the mean
156 value calculated over the three gels was used for statistical analysis.

157

158 *Protein identification by mass spectrometry.*

159 Spots of interest were excised, and the proteins were subjected to in-gel tryptic digestion and
160 peptide extraction using a Montage In-Gel Digest96 ZP kit (Millipore, Billerica, USA). Excised spots

161 were destained using a 25 mM ammonium bicarbonate (NH₄HCO₃) and 5% (v/v) acetonitrile (ACN)
162 solution then a 25 mM NH₄HCO₃ and 50% (v/v) ACN solution. The spots were dehydrated using a
163 100% ACN solution and the proteins were digested overnight with a solution of 10 ng/μl trypsin in a
164 25 mM NH₄HCO₃ buffer (37 °C). The peptides were extracted using a 100% ACN solution and
165 analysed using a Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight (MALDI-TOF) mass
166 spectrometer Voyager DE-Pro model (Perspective BioSystems, Farmingham, MA, USA). External
167 calibration was performed with a standard peptide solution (Proteomix, LaserBio Labs, Sophia-
168 Antipolis, France). Internal calibration was performed using peptides resulting from auto-digestion of
169 porcine trypsin. Proteins were identified from their peptide mass fingerprinting, searching the National
170 Center for Biotechnology Information (NCBI) protein sequence database using the MASCOT and
171 PROFOUND software (<http://www.matrixscience.com> and <http://prowl.rockefeller.edu>). The initial
172 search parameter allowed a single trypsin missed cleavage, carbamidomethylation of cystein, partial
173 oxidation of methionine, and a *m/z* error of 25 ppm.

174

175 3- Statistical analysis.

176

177 Statistical procedures and analysis were carried out using the XLstat addinsoft version 7.5.3
178 (Microsoft Corporation, Seattle, USA). Intensity-dependent normality of the distribution was verified
179 according to Meunier et al. (2005). Normal distribution of proteomic data was verified using the
180 Shapiro-Wilk test and proteins with abnormal distributions were normalised using the Box-Cox
181 procedure.

182 Effects of rearing method, genetic background, gender and various interactions between these
183 factors on spots quantities and meat quality traits were tested for significance at the 5% level by 3-way
184 ANOVA and reported by Kwasiborski et al. (2008a). Analyses reported in the present paper aim to
185 identify couples or single proteins allowing correct classification of pigs according to their treatment
186 group. The procedure was based on Principal Component Analysis (PCA) because they allow the
187 association of variables, i.e. protein levels, with main components, i.e. the treatment factors of the
188 present study. In the previous paper, we determined proteins influenced by each treatment factor,
189 rearing environment, sire breed and gender. In the present study, PCA were carried out using proteins
190 influenced by a single treatment factor. In the resulting bi-plot, a straight line was drawn separating as
191 many animals as possible according to the treatment factor. Number of pigs correctly classified on
192 either side of the line was determined. Subsequently, proteins with the lowest loadings on the first axis
193 were removed and the PCA was repeated, including the bi-plots. The procedure was repeated until
194 only two proteins remained, which were considered the first couple allowing classification of as many
195 pigs as possible according to their treatment group. Subsequently, the PCA procedure was repeated on
196 the initial data, after removal of these two proteins. If no further couples were found the procedure was
197 stopped. For each treatment factor, a PCA was carried out on the retained proteins and *post-mortem*

198 Table 1: Identification of proteins influenced by treatment factors; rearing environment, breed
 199 of sire and gender. Unidentified proteins are not shown.

Spot no.	Protein name	Spot quantity (ppm)	
		Indoor	Outdoor
Rearing environment			
Glycolytic pathway			
4207	Beta-enolase 3	3410.1 ± 1154.9	2348.4 ± 533.3
7103	Phosphoglycerate mutase 1	1235.0 ± 323.3	978.4 ± 210.0
4001	Triosephosphate isomerase	1004.8 ± 435.7	627.1 ± 316.2
Oxygen binding			
6004	Chain B Myoglobin	186.5 ± 19.4	323.8 ± 18.5
6017	Chain B Myoglobin	164.1 ± 14.8	312.2 ± 16.7
Chaperone and regulation			
5104	CGI-29 protein	374.0 ± 138.5	494.3 ± 161.0
3422	Chain D, Aldehyde Dehydrogenase	5811.1 ± 1235.6	4380.9 ± 916.5
3303	Guanosine diphosphate dissociation inhibitor 2	225.4 ± 69.8	286.8 ± 89.1
2516	Heat shock protein 72kDa	5695.0 ± 1112.8	8348.1 ± 1882.0
4101	Peroxiredoxin 6	1122.6 ± 0.4	734.1 ± 0.4
Miscellaneous			
8015	Cofilin 2	420.3 ± 0.5	1018.7 ± 0.6
5227	cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	84914.6 ± 1126.4	75673.2 ± 12018.2
1107	Pyridoxal phosphatase	453.6 ± 86.5	375.3 ± 46.3
Breed of sire			
		Duroc sired	Large White sired
Glycolytic pathway			
5313	Beta-enolase 3	10667.8 ± 5342.4	14020.5 ± 4634.2
4418	Pyruvate kinase, isozyme M1	302.4 ± 138.7	134.6 ± 190.4
Chaperone and regulation			
2615	Heat shock protein 73kDa	2321.3 ± 742.3	1423.4 ± 830.7
Myofibrillar structure			
13	Parvalbumin alpha (muscle)	6309.8 ± 3252.2	10186.7 ± 2661.6
Miscellaneous			
3202	Aminoacylase I	3008.1 ± 402.1	2376.0 ± 620.9
Gender			
		Castrated male	Female
Glycolytic pathway			
5202	3-phosphoglycerate kinase	3781.6 ± 1653.1	7120.2 ± 2217.1
4209	Beta-Enolase 3	602.3 ± 174.2	1019.2 ± 312.3
4213	Beta-Enolase 3	395.6 ± 122.1	572.7 ± 184.0
4215	Beta-Enolase 3	6022.6 ± 0.5	8601.9 ± 0.4
5215	Beta-Enolase 3	891.8 ± 182.8	1272.2 ± 244.7
5216	Beta-Enolase 3	10002.6 ± 2430.2	13156.5 ± 2551.4
5217	Beta-Enolase 3	666.4 ± 220.0	490.5 ± 228.0
5321	Enolase 1	1518.3 ± 489.2	2186.6 ± 388.1
5126	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	166.6 ± 70.0	296.6 ± 110.5
6110	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	3171.6 ± 0.7	6942.5 ± 0.5
7019	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	219.7 ± 97.9	327.6 ± 99.1
6518	Phosphoglyceratemutase-1	54966.4 ± 11125.6	68368.7 ± 13799.1
5414	Pyruvate kinase isozyme M1	397.5 ± 114.2	600.8 ± 145.0
6116	triosephosphate isomerase	164.3 ± 59.1	279.1 ± 76.6
6125	triosephosphate isomerase	55896.9 ± 9455.5	65997.0 ± 9139.4
Citric acid cycle			
5104	CGI-29 protein	359.9 ± 115.9	508.5 ± 166.9
6107	Esterase D	3164.3 ± 490.5	4463.2 ± 776.9
4204	Isocitrate dehydrogenase alpha chain	403.6 ± 173.1	767.6 ± 336.9
3518	Malate dehydrogenase	958.7 ± 0.3	1717.7 ± 0.5
4106	Malate dehydrogenase	13175.0 ± 4714.9	18277.7 ± 4556.0

Spot no.	Protein name	Spot quantity (ppm)	
		Castrated male	Female
Gender			
Chaperone regulation and detoxification			
5020	Alpha-b crystallin	130.2 ± 0.7	1.5 ± 0.3
121	Annexin 5	302.8 ± 2.9	43.2 ± 3.5
2004	Dj1 protein	206.7 ± 27.1	168.4 ± 44.3
3303	Guanosine diphosphate dissociation inhibitor 2	288.7 ± 87.0	223.5 ± 70.7
3308	Guanosine diphosphate dissociation inhibitor 2	692.6 ± 132.3	454.9 ± 244.5
3114	Heat shock 27kDa protein 1	3818.2 ± 6.2	324.0 ± 4.8
Phosphotransferase			
2308	Creatine kinase B chain	336.3 ± 0.6	183.4 ± 0.4
6106	Muscular creatine kinase	905.3 ± 576.6	1290.8 ± 306.8
7107	Muscular creatine kinase	348.5 ± 101.5	495.7 ± 163.9
7220	Muscular creatine kinase	1324.5 ± 347.5	1880.5 ± 606.4
Myofibrillar and cytoskeleton structure			
11	Ca2+-binding protein-like protein	5717.1 ± 3.6	355.7 ± 6.3
12	Ca2+-binding protein-like protein	4684.8 ± 2125.1	2471.9 ± 1234.3
38	Ca2+-binding protein-like protein	15070.4 ± 4322.7	8043.5 ± 3410.6
1335	Chain A. structural basis of actin	2877.0 ± 0.6	478.1 ± 0.7
1336	Chain A. structural basis of actin	37194.0 ± 0.9	7765.5 ± 0.5
3004	Cofilin 2	234.3 ± 132.2	64.4 ± 51.4
31	Myosin light chain 2	6770.5 ± 0.7	477.7 ± 0.9
34	Myosin light chain 2	140.9 ± 0.9	1.5 ± 0.3
1006	Myosin light chain 2	816.7 ± 379.0	353.9 ± 242.6
110	Tropomyosin 1 alpha	12670.6 ± 0.8	2146.4 ± 0.9
105	Tropomyosine 2 beta	5736.7 ± 0.8	580.6 ± 0.6
6208	Troponin T fast skeletal muscle type	2303.4 ± 7.9	523.8 ± 6.9
Iron binding			
6122	Haptoglobin alpha 15	226.3 ± 0.5	481.3 ± 0.6
5613	Transferrin	1644.7 ± 866.0	3489.0 ± 1234.8
Miscellaneous			
7006	Adenylate kinase isoenzyme 1	313.1 ± 134.5	208.5 ± 62.1
4411	Antiquitin	797.4 ± 167.5	1159.4 ± 215.0
6003	Biliverdin reductase B	405.0 ± 104.5	526.5 ± 118.6
4102	Bisphosphoglycerate mutase	1846.0 ± 417.3	2539.0 ± 760.7
4205	Cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	3741.8 ± 0.2	5125.6 ± 0.4
5203	Dimeric dihydrodiol dehydrogenase	781.8 ± 160.4	1044.4 ± 162.8
2209	Four and a half LIM domains 3	263.6 ± 103.4	230.9 ± 163.9
5614	GARS protein	487.6 ± 0.5	1019.7 ± 0.5
4410	Leucine aminopeptidase	1382.6 ± 568.9	2123.7 ± 829.7
2302	Mitochondrial Cytochrome Bc1 Complex	648.7 ± 1.9	47.4 ± 4.1
7017	Phosphatidylethanolamine binding protein	138.2 ± 0.0	28309.0 ± 0.0
5124	Proteasome endopeptidase complex chain C2	1049.1 ± 284.6	1648.7 ± 287.6
5002	Proteasome subunit beta type 2	572.6 ± 133.8	911.9 ± 135.4
4306	S-adenosylhomocysteine hydrolase	536.9 ± 148.5	772.0 ± 240.7
5401	Tripartite motif protein 50	840.2 ± 11.7	339.2 ± 9.0

202 muscle traits and Pearson correlations were calculated, to study their relationships. Where useful, if
203 analysis of variance had detected interactive treatment effects on the protein (cf Kwasiborski et al.,
204 2008a), t-tests were employed to clarify variations between treatment groups.

205 For many proteins, intracellular functions, and/or the biochemical processes they are related to,
206 are known. However, we lack precise information. For example, biochemical activity of proteins often
207 depends on the isoform, contained in different spots on the electrophoresis gel. However, mass
208 spectrometry only specifies the name of the protein, not its form (Hamelin et al., 2006). In order to
209 interpret the relationship between the level of the protein and the subgroup the animal belongs to, the
210 biochemical status of the tissue that the protein levels reflect is of interest. Proteomic data sets show
211 many cross-correlations between proteins that can consequently be re-grouped in clusters, representing
212 similar biochemical phenomena (Sayd et al., 2006; Laville et al., 2007). Therefore, Pearson
213 correlations were calculated between proteins to help to identify the intracellular biochemical
214 mechanisms reflected by the proteins retained by the model, including those spots that remained
215 unidentified.

216

217 **RESULTS**

218

219 *Meat quality*

220 As indicated in Kwasiborski et al. (2008a), ultimate pH was lower ($p < 0.01$) in female (5.47 ± 0.09)
221 than castrated male pigs (5.63 ± 0.23). There was further an interaction between rearing environment
222 and sire breed, with lower ($p < 0.05$) ultimate pH in outdoor Duroc (5.50 ± 0.05) and indoor Large
223 White-sired pigs (5.45 ± 0.10) than outdoor Large White (5.62 ± 0.33) and indoor Duroc-sired pigs
224 (5.62 ± 0.18). Glycogen levels (45 min *post-mortem*) were influenced by a rearing environment x sire
225 breed interaction (higher ($p < 0.05$) levels in indoor Large White-sired pigs compared to the other
226 groups) and a gender x sire breed interaction (higher ($p < 0.05$) levels in female Large White-sired pigs
227 compared to the other groups). Differences in glycolytic potential between castrated males ($123.3 \pm$
228 28.2) and females (142.2 ± 18.8) did not reach significance ($p = 0.11$). No treatment differences were
229 found for the other *post-mortem* muscle traits.

230 Out of 248 matched protein spots, 122 protein spots showed a difference in level according to one
231 or several treatments. A posteriori power calculations show that for rearing environment, power was
232 between 14 (Guanosine diphosphate dissociation inhibitor 2 and CGI29 protein) and 100% (e.g.
233 cofilin and 2 isoforms of Chain B myoglobin). For sire breed sire power ranged between 12 and 22%,
234 and for gender between 7 (Four and a half LIM domains 3) and 100 % (21 proteins, e.g. Ca^{2+} -binding
235 protein-like protein – spot 11). Seventy-six proteins were successfully identified by mass spectrometry
236 (Table 1). The remaining proteins were either not in the databases or the protein quantity in the
237 excised spots was too low to allow identification by the mass spectrometer. The effects of the
238 treatment factors on protein levels can be found in detail in Kwasiborski et al. (2008a).

239 Table 2: Number of pigs correctly classified according to gender using first the 75 proteins influenced
 240 by gender and subsequently progressively removing those with the lowest factor loadings

Spot number of the proteins retained in PCA	all	MLC2 TRP2 β ACT ACT Unid Cyt Bc1	MLC2 TRP2 β ACT ACT Cyt Bc1	MLC2 TRP2 β ACT ACT	MLC2 TRP2 β ACT	TRP2 β ACT
Number of classified pigs according to gender	24	24	24	24	24	24

241

242

243

244 Table 3: Relevant selection of the 67 and 53 identified proteins correlated with intensities of the spots
 245 identified as isoform 2 β of tropomyosin and actin (24 pigs). Isoform 2 β of tropomyosin and actin were
 246 proteins allowing correct classification of 24 pigs in PCA according to their gender.

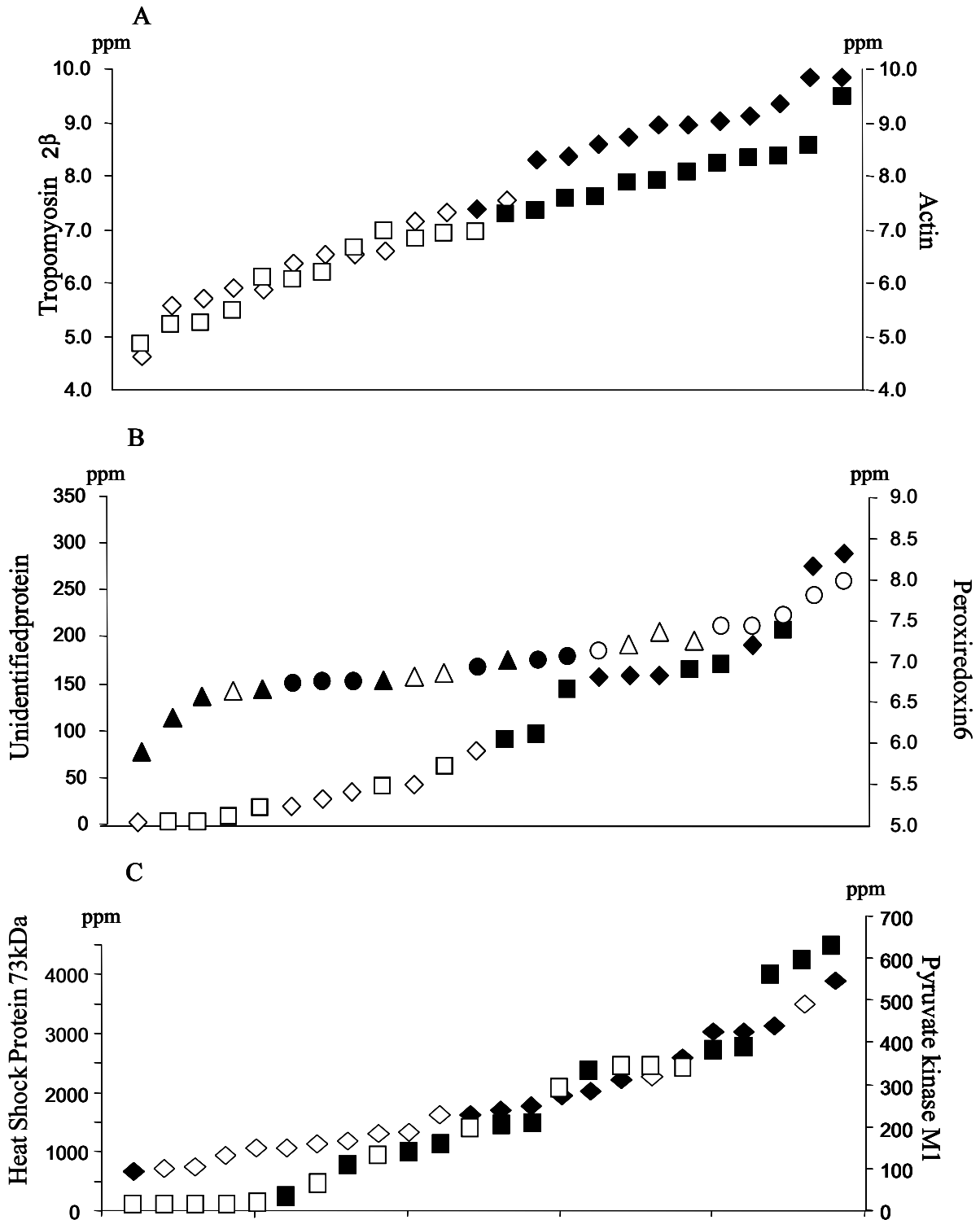
247

Protein	Pearson r-value	p-value	Protein	Pearson r-value	p-value
Tropomyosin 2β			Actin (spot 1335)		
β enolase 3	-0.70	<0.001	β enolase 3	-0.68	<0.001
Triosephosphate dehydrogenase	-0.63	<0.01	β enolase 3	-0.67	<0.001
β enolase 3	-0.59	<0.01	Enolase 1	-0.63	0.001
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-0.57	<0.01	Cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	-0.59	<0.01
Cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	-0.56	<0.01	Triosephosphate dehydrogenase	-0.56	<0.01
β enolase 3	-0.54	<0.01	Cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	-0.50	0.01
Enolase 1	-0.53	<0.01	Triosephosphate dehydrogenase	-0.49	0.02
Pyruvate kinase M1	-0.53	<0.01	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-0.48	0.02
Triosephosphate dehydrogenase	-0.53	<0.01	β enolase 3	-0.47	0.02
β enolase 3	-0.50	0.01	Pyruvate kinase M1	-0.47	0.02
β enolase 3	-0.48	0.02	β enolase 3	-0.46	0.02
Cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	-0.47	0.02	Pyruvate kinase M1	-0.46	0.02
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-0.46	0.02	β enolase 3	-0.44	0.03
Cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	-0.44	0.03	Myosin light chain 2	0.87	<0.0001
Tropomyosine 1 α	0.90	<0.0001	Actin	0.86	<0.0001
Myosin light chain 2	0.88	<0.0001	Tropomyosine 2 β	0.85	<0.0001
Actin (spot 1335)	0.85	<0.0001	Tropomyosine 1 α	0.79	<0.0001
Actin	0.85	<0.0001	Myosin light chain 2	0.74	<0.0001
Myosin light chain 2	0.73	<0.0001	Myosin light chain 2	0.74	<0.0001
Troponin T	0.71	<0.001	Cofilin 2	0.71	<0.0001
Cofilin 2	0.69	<0.001	Troponin T	0.61	<0.01
Myosin light chain 2	0.68	<0.001	Heat shock protein 27kDa	0.59	<0.01
Heat shock protein 27kDa	0.58	<0.01			
Cofilin 2	0.47	0.02			

248

249 Figure 1: Values of proteins retained by the PCA procedure (see Material and Methods) of individual
 250 pigs allowing classification of pigs as best as possible according to a) gender (rhombus: tropomyosin
 251 2 β ; squares: actin), b) rearing environment and gender (rhombus (outdoor rearing) and squares (indoor
 252 rearing): unidentified protein; triangle (outdoor rearing) and circles (indoor rearing): peroxiredoxin 6)
 253 and c) sire breed (rhombus: heat shock protein 73kDa; squares: pyruvate kinase M1). Filled and open
 254 symbols represent castrated male and female pigs, respectively (Fig. 1a, b) or Duroc and Large White-
 255 sired pigs, respectively (Fig. 1c).

Figure 1



256 *Gender.*

257 Using the 75 proteins influenced by gender, PCA allowed correct classification of 24 pigs
258 according to their treatment group. Progressively removing proteins with the lowest loadings on the
259 first axis, isoform 2 β of tropomyosin (**TRP2 β**), and an actin (**ACT**) isoform (spot 1335) were found to
260 allow correct classification of the 24 pigs (Table 2). Plots of individual values show that the ACT
261 isoform and TRP2 β alone allow correct classification of 24 and 23 pigs, respectively (Fig.1A).

262 ACT and TRP2 β were significantly correlated with 63 and 57 identified proteins, respectively, the
263 most relevant of which are presented in Table 3. Using all 24 pigs, both proteins were positively
264 correlated with other proteins related to the contractile apparatus: other isoforms of ACT and
265 tropomyosin, as well as isoforms of the myosin light chain 2 (**MLC2**), of troponin T (**TNT**), Heat
266 Shock Protein 27 kD (**HSP27**) and cofilin 2 (**COF2**) (Kwasiborski et al., 2008 a). They were also
267 negatively correlated with several enzymes of glycolytic pathway: 5 isoforms of enolase (**ENO**), as
268 well as cytosolic isoforms of glycerol-3-phosphate dehydrogenase (**cG3PDH**), glyceraldehyde-3-
269 phosphate dehydrogenase (**GAPDH**), pyruvate kinase M1 (**PKM1**) and triosephosphate isomerase
270 (**TPI**).

271 Repeating the PCA and individual plot procedures excluding ACT and TRP2 β from the data set,
272 determined that similarly, an MLC2 isoform (spot 31) and cytochrome Bc1 (**Cyt Bc1**) classified each
273 correctly 24 pigs according to gender. Cyt Bc1 is a component of the respiratory chain involved in
274 mitochondrial electron transport during oxidative phosphorylation of ADP to ATP. Another ACT
275 isoform (spot 1336) classified correctly 21 pigs. Cyt Bc1 levels were correlated ($p < 0.01$) with the
276 various myofibrillar proteins (e.g. MLC2: $r = 0.86$; ACT: $r = 0.74$). On the level of the whole group, the
277 retained proteins were mostly unrelated to *post-mortem* muscle traits, with exception of a correlation
278 between ACT (spot 1335) and ultimate pH ($r = 0.42$; $p < 0.05$). Using only females, glycogen content
279 (45 min *post-mortem*) was correlated with intensity of the retained TRP2 β ($r = 0.70$; $p = 0.01$) and ACT
280 (1336) spots ($r = -0.79$; $p < 0.005$) and ultimate pH with intensity of both retained ACT spots (both spots:
281 $r = 0.82$; $p < 0.005$; Fig. 2). Intensities of these proteins were influenced by a sire breed x gender
282 interaction ($p < 0.05$) and correlations were explained by breed effects (cf Fig 2), as Large White-sired
283 females had lower ($p < 0.01$) intensities of the TRP2 β and ACT isoform spots, and, as indicated above,
284 higher glycogen levels (45 min *post-mortem*) and lower ultimate pH than Duroc-sired females.

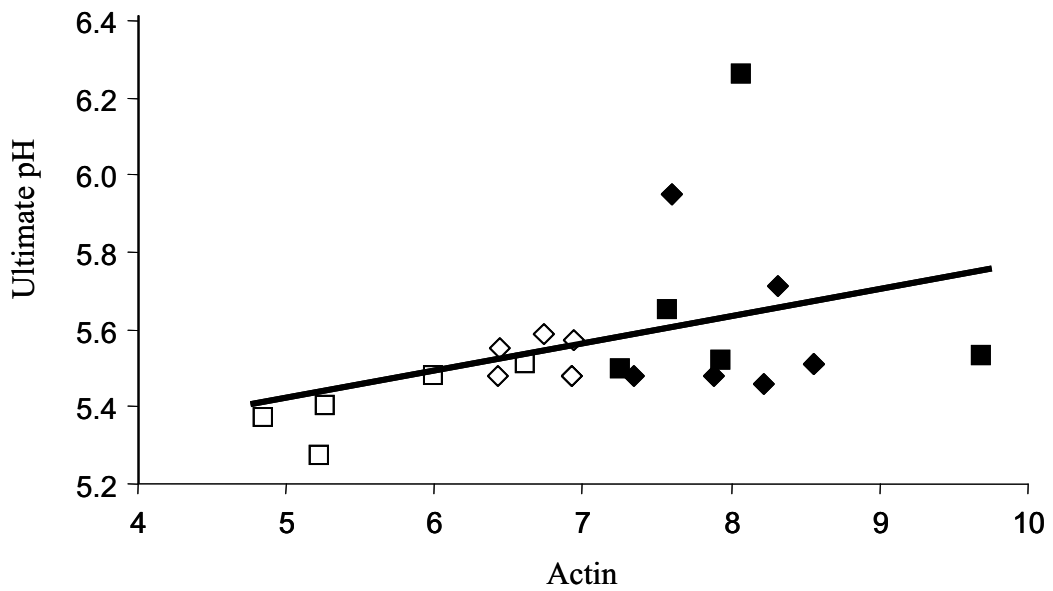
285

286 *Rearing environment.*

287 Using the 17 proteins influenced by rearing environment, PCA allowed correct classification of 22
288 pigs according to their treatment group (Table 4). Removal of the 11 proteins with the lowest loadings
289 allowed correct classification of 19 pigs according to rearing method. Following progressive removal
290 of proteins with lower loadings, 2 proteins, isoform 6 of peroxiredoxin (**PRDX6**), a powerful
291 antioxidant (Manevich and Fisher, 2005), and an unidentified protein (spot 1021) allow correct
292 classification of only 12 pigs according to rearing environment (Table 4). More detailed inspection of

293 Figure 2: Scatter plot containing the values of ultimate pH and actin (spot 1335). Rhombuses and
294 squares represent Duroc and Large White-sired pigs, respectively, and black and white symbols
295 represent castrated males and females, respectively.
296

Figure 2



297 Table 4: Number of pigs correctly classified according to their rearing environment and gender using
 298 first the 17 proteins influenced by rearing environment and subsequently progressively removing those
 299 with the lowest factor loadings.

Spot number of the proteins retained in PCA		All	Unid ALDH PRDX6 βENO3 cG3PDH COF2	Unid ALDH PRDX6 βENO3 COF2	Unid ALDH PRDX6 COF2	Unid ALDH PRDX6	Unid PRDX6
Number of classified pigs according to their rearing environment / gender	Rearing method	23	19	20	21	17	12
	Gender	22	21	22	24	24	24
	Indoor male	5	5	5	6	6	6
	Indoor female	5	6	6	6	5	6
	Outdoor male	6	5	6	5	5	5
	Outdoor female	6	3	5	6	6	6

300

301 Table 5: Proteins correlated with intensity of the spot identified as Peroxiredoxin 6 and the
 302 unidentified spot (24 pigs), together allowing correct classification of 24 pigs in PCA according to
 303 rearing environment and gender.

Protein	Pearson r-value	p-value	Protein	Pearson r-value	p-value
Unidentified protein			Peroxiredoxin 6		
β Enolase 3	-0.65	0.001	Myosin light chain 2	-0.71	<0.001
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-0.62	0.001	Myosin light chain 2	-0.64	0.001
Triosephosphate dehydrogenase	-0.57	<0.01	Tropomyosin 2 β	-0.64	0.001
Triosephosphate dehydrogenase	-0.53	<0.01	Actin (spot 1335)	-0.61	<0.01
β Enolase 3	-0.53	<0.01	Actin	-0.58	<0.01
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-0.51	0.01	Cofilin 2	-0.57	<0.01
β Enolase 3	-0.50	0.01	Myosin light chain 2	-0.49	0.02
β Enolase 3	-0.49	0.02	Tropomyosin 1 α	-0.46	0.02
Enolase 1	-0.45	0.03	Cofilin 2	-0.43	0.04
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-0.44	0.03	Pyruvate kinase M1	0.77	<0.0001
Pyruvate kinase M1	-0.43	0.04	Enolase 1	0.70	<0.001
Tropomyosin 2β	0.85	<0.0001	β enolase 3	0.67	<0.001
Myosin light chain 2	0.77	<0.0001	Cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	0.60	<0.01
Ca ²⁺ binding protein	0.75	<0.0001	β enolase 3	0.54	<0.01
Actin (spot 1335)	0.75	<0.0001	Pyruvate kinase M1	0.52	<0.01
Tropomyosin 1α	0.75	<0.0001	Triosephosphate isomerase	0.52	<0.01
Myosin light chain 2	0.74	<0.0001	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0.49	0.02
Actin	0.72	<0.0001	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0.47	0.02
Cofilin 2	0.69	<0.001	Cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	0.44	0.03
Myosin light chain 2	0.68	<0.001			
Ca ²⁺ binding protein	0.60	<0.01			
α-b-crystallin	0.58	<0.01			
Ca ²⁺ binding protein	0.57	<0.01			
Troponin T	0.57	<0.01			

304 the data shows however, that results were much improved if gender is taken into account: 23 pigs are
305 correctly classified by these 2 proteins according to their subgroup gender/rearing environment (Fig.3;
306 Table 4). Overall, PRDX6 levels were negatively correlated with those of the unidentified protein ($r=-$
307 0.54; $p<0.05$), but not within the gender/rearing environment subgroups (Fig.4). The individual
308 proteins did not classify pigs correctly (Fig. 1B). PRDX6 is influenced by rearing environment (table
309 1), and in addition a gender x rearing environment interaction: outdoor castrated males (583.0 ± 164.1
310 ppm) and females (885.2 ± 194.5 ppm) differ significantly from each other ($p<0.05$) and indoor
311 females (1473.6 ± 392.3) differ significantly ($p<0.05$) from all other groups (indoor castrated males
312 771.6 ± 101.5) (data from Kwasiborski et al., 2008a). PRDX6 was negatively correlated with 9
313 proteins involved in muscle contraction: ACT, tropomyosin (**TRP**), COF2, and MLC2 isoforms. It
314 was positively correlated with 10 enzymes involved in the glycolytic pathway: isoforms of cG3PDH,
315 GAPDH, PKM1, ENO and TPI (Table 5). In contrast, the unidentified protein was negatively
316 correlated with enzymes involved in the glycolytic pathway: ENO, GAPDH, TPI and PKM1 isoforms,
317 and positively with proteins involved in muscle contraction: a calcium binding protein (**CBP**), MLC2,
318 ACT, TRP and TNT isoforms, HSP27, α -b-crystallin (**α BCRYST**) and COF2 (Table 5). The same
319 classification results were obtained when the unidentified protein was replaced by any of the proteins
320 allowing classification according to gender (ACT, TRP2 β MLC2, Cyt Bc1). The unidentified protein
321 was correlated with ultimate pH ($r=0.41$; $p<0.05$).

322

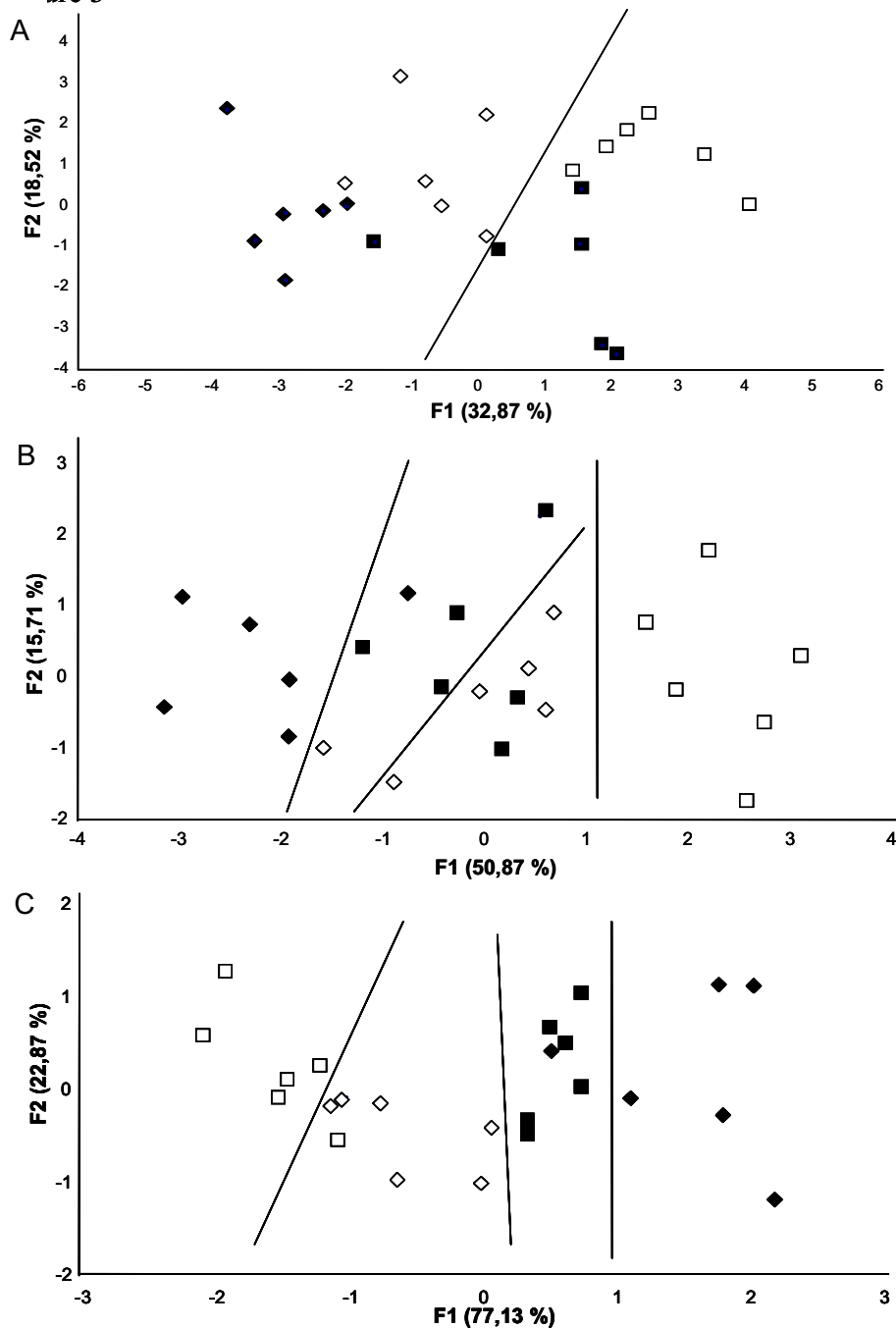
323 *Sire breed.*

324 Using the 9 proteins influenced by sire breed, PCA allowed correct classification of 22 pigs
325 according to their treatment group (Table 6). Removing progressively proteins with the lowest
326 loadings on the first axis, Heat Shock Protein 73kDa (**HSP73**), and PKM1, allowed correct
327 classification of 21 pigs according to sire breed (Table 6). Plots of individual values show that the
328 HSP73 alone also correctly classifies 21 pigs according to sire breed, while PKM1 classifies only 17
329 pigs correctly (Fig. 1C). Consequently, PKM1 was discarded from further analysis. HSP73 (or
330 HSC73) is a chaperone protein of the Heat Shock Protein 70kDa (HSP70) family. HSP73 was
331 negatively correlated (Table 7) with another HSP70 isoform, α -Parvalbumin (**α Parv**), a calcium
332 binding protein involved in muscle relaxation, and positively to two PKM1 isoforms, the E3 isoform
333 of aldehyde dehydrogenase (**ALDH9**), implicated in the pyridine nucleotide-dependent oxidation of
334 aldehyde to acid and believed to be essential for normal muscle development (Sladek, 2003),
335 peroxiredoxin 6 (**PRDX6**), unique antioxidant enzyme that can directly reduce phospholipid
336 hydroperoxide in mammalian cells (Imai and Nakagawa, 2003), and Heat shock cognate 70kDa
337 (**HSC70**), related to muscle growth and implicated in the regulation of the proteolytic pathways during
338 muscle development and regeneration (Lametsch et al., 2006). The retained proteins were not
339 correlated to *post-mortem* muscle traits (cf Fig. 5).

340

341 Figure 3: Illustration of the statistical procedure and results for the treatment factor “rearing
342 environment”: Bi-plots resulting from successive Principal Component Analyses (PCA) carried out
343 using proteins influenced by rearing environment. In each bi-plot, straight lines were drawn separating
344 as many animals as possible according to the treatment factor. Subsequently, the PCA was repeated
345 (including the bi-plots) progressively removing proteins with the lowest loadings on the first axis. For
346 treatment factor “rearing environment”, it was found that the final bi-plot resulting from this procedure
347 classified pigs according to rearing environment but also gender. Graphs represent bi-plots, using a)
348 the 17 proteins influenced by rearing environment, b) the 6 proteins with the highest factor loadings in
349 the PCA, c) the 2 proteins with the highest factor loadings in the PCA.
350

Figure 3



351 Table 6: Number of pigs correctly classified according to sire breed using first the 9 proteins
 352 influenced by sire breed and subsequently progressively removing those with the lowest factor
 353 loadings.

354

Spot number of the proteins retained in PCA	all	α Parv Unid HSP73 Unid ACY1 PKM1	α Parv Unid HSP73 Unid PKM1	α Parv Unid HSP73 PKM1	α Parv HSP73 PKM1	HSP73 PKM1
Number of pigs correctly classified according to breed of sire	22	21	21	20	20	21

355

356

357

358

359

360

361 Table 7: Proteins correlated with intensity of the spot identified as Heat shock protein 73kDa (24
 362 pigs). Heat shock protein 73kDa is a protein allowing correct classification of 21 pigs according to sire
 363 breed.

364

365

Protein	Pearson value	p-value
Heat shock protein 73kDa		
α Parvalbumin	-0.50	0.01
Heat shock protein 70kDa	-0.41	0.05
Peroxiredoxin 6	0.42	0.04
Heat shock cognate 70kDa	0.43	0.04
Pyruvate kinase M1	0.47	0.02
Aldehyde dehydrogenase E3	0.53	<0.01
Pyruvate kinase M1	0.54	<0.01

366 DISCUSSION

367

368 The present study aimed to identify proteins that allow the classification of pigs according to their
369 gender, rearing environment or sire breed. Only proteins earlier found to be influenced by these
370 different treatment factors were used (Kwasiborski et al., 2008 a). Results show that using single,
371 specific proteins, 24 and 21 pigs could be correctly classified according to gender and sire breed,
372 respectively. Using 2 proteins, 22 pigs could be correctly classified according to rearing environment,
373 but only if gender was also taken into account.

374

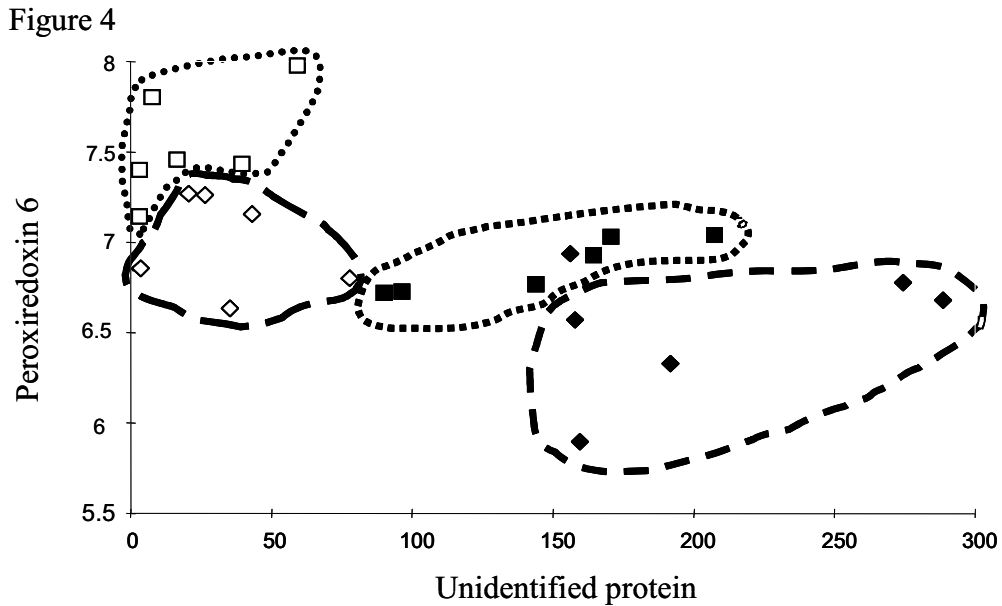
375 *Gender*

376 An ACT isoform, a MLC2 isoform and Cyt Bc1 had higher levels in castrated males than females
377 and allowed correct classification of all pigs according to gender. TRP2 β and another ACT isoform
378 allowed correct classification of 23 and 21 pigs, respectively. We earlier demonstrated that higher
379 levels of myofibrillar proteins in the soluble cellular fraction of muscles of castrated males were
380 related to higher extractability measured by Bradford values (Kwasiborski et al., 2008 a). This higher
381 extractability is very probably related to a higher solubility of these proteins in the extraction buffer
382 used (Sayd et al., 2006) and suggests that less actomyosin was formed, or that the actomyosin complex
383 is less stable, in muscle samples of castrated males. Calcium plays a central role in the fixation of
384 myosin heads on actin filaments. It has been shown that both female and male sex hormones stimulate
385 intracellular calcium release (Rubio-Gayosso et al., 2000; Estrada et al., 2006). We have therefore
386 suggested that lower intracellular calcium levels in castrated males may explain lower levels of
387 actomyosin in the early *post-mortem* muscle (Kwasiborski et al., 2008a).

388 Cyt Bc1 also classified all pigs correctly according to gender. We reported earlier that muscle cells
389 of female pigs contained more enzymes related to the glycolytic pathway and the citric acid cycle,
390 suggesting that they have a more carbohydrate and less lipid-based metabolism compared to castrated
391 males. We further suggested that higher Cyt Bc1 levels of castrated males are related to increased lipid
392 β -oxidation, producing acetyl-CoA and electrons, which both enter the respiratory chain via Cyt Bc1
393 (Kwasiborski et al., 2008 a). Myosin heavy chain (MHC) type I (present in slow-contracting oxidative
394 fibres) is expected to exist at higher levels in castrated males as it can use lipid as energy source, and
395 this may explain the positive correlation between Cyt Bc1 and myofibrillar contents: MHC type I has a
396 slower contraction speed than type II (present in fast-contracting oxidative and glycolytic fibres)
397 leading to less post-mortem actomyosin formation and larger amounts of extracted myofibrillar
398 proteins. A shift from type II to type I myosin heavy chains in castrated males compared to females
399 could be related to the above suggested change in calcium levels due to low levels of sex hormones
400 (Rubio-Gayosso et al., 2000; Estrada et al., 2006). Several studies support this suggestion. Repeated
401 exercise generally induces shifts from fast to slow types of myosin and these shifts depend on elevated
402 intracellular calcium levels. These increased intracellular calcium levels result in changes in soluble

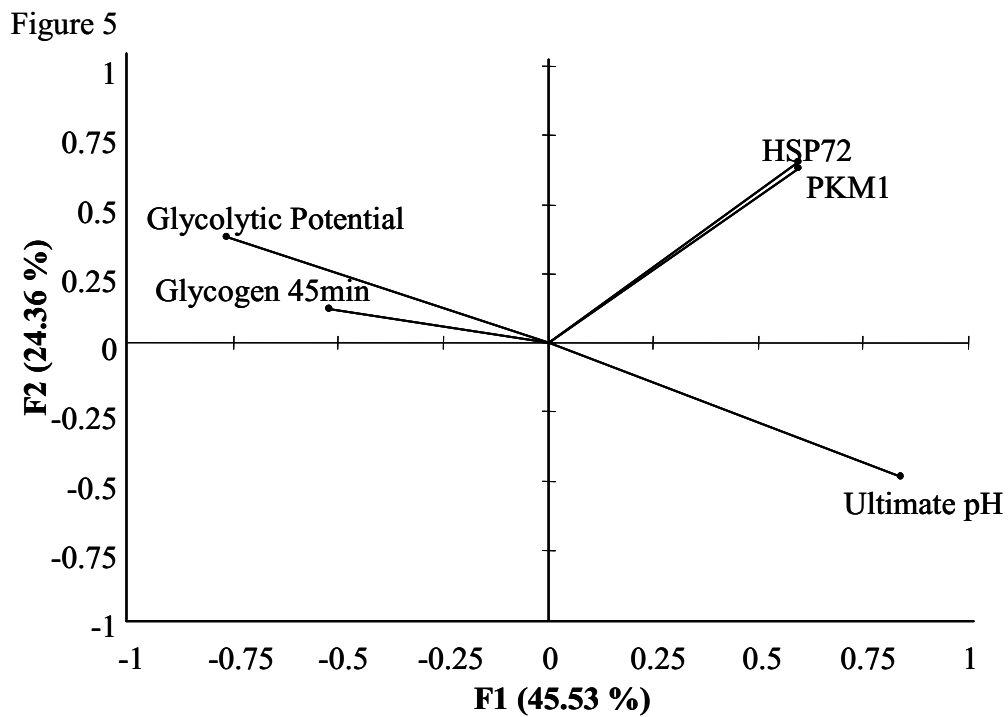
403 Figure 4: Scatter plot containing the values of the unidentified proteins and peroxiredoxin 6, i.e. the
 404 proteins retained by the PCA procedure allowing correct classification of 22 pigs according to rearing
 405 environment/gender.

406
 407
 408
 409
 410
 411
 412
 413
 414
 415
 416
 417
 418
 419



420 Figure 5: PCA plot showing the relative absence of relationships between proteins allowing
 421 classification of pigs according to sire breed, and meat quality parameters.

422



423 proteins involved in calcium dynamics, such as parvalbumin, Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinases,
424 and calcineurin (Klug et al., 1983; Berchtold et al., 2000; Rose and Hargreaves, 2003), which mediate
425 changes in expression of skeletal genes related to fibre type (Klug et al., 1983; Olson and Williams,
426 2000; Chin, 2005). Such a shift in contractile properties between females and castrated males would
427 be coherent with the observed gender differences in glycogen content and ultimate pH. The
428 differences between Large White and Duroc-sired females indicate that in addition to gender, sire
429 breed influences also muscle fibre characteristics.

430 In summary, Large White-sired females were characterised by higher levels of TRP2 β and ACT,
431 higher glycogen levels 45 min *post-mortem* and lower ultimate pH, compared to castrated males of
432 both sire breeds. Duroc-sired females had intermediate levels for all these traits. These variations,
433 suggestive of differences in extractability of myofibrillar proteins and early *post-mortem* contractile
434 activity may be related to differences in contractile properties of the muscle fibres. This hypothesis
435 needs confirmation as the methodology we used did not extract myosin heavy chains, and their types
436 could consequently not be quantified.

437

438 *Rearing environment*

439 Pigs could only be classified according to rearing environment if gender was taken into account.
440 PRDX6 is expressed in nearly all tissues including skeletal muscle and protects cells against oxidative
441 stress (Wang et al., 2003). PRDX6 allowed distinguishing indoor females that had the highest, from
442 outdoor castrated males that had the lowest levels. However PRDX6 levels did not allow
443 distinguishing outdoor females from indoor castrated males. An unidentified protein (spot 1021)
444 classified all pigs correctly according to gender and the association of the two proteins correctly
445 classified 23 pigs according to gender and rearing environment. Compared to outdoor pigs and to
446 castrated males, indoor pigs and females had higher PRDX6 levels and lower levels of the unidentified
447 protein. Correlations indicate that high levels of PRDX6 and low levels of the unidentified protein
448 were associated with lower amounts of extracted myofibrillar proteins (i.e. higher early *post-mortem*
449 muscle contractile activity), and higher levels of enzymes of the glycolytic pathway (i.e. higher
450 glycolytic capacity) (Kwasiborski et al., 2008a). These differences are in accordance with our earlier
451 findings that female pigs had a more glycolytic and castrated males a more lipid based metabolism, as
452 indicated above, and that indoor and outdoor pigs had more glycolytic and oxidative oriented
453 metabolisms, respectively (Kwasiborski et al., 2008a). Values of the unidentified protein show a
454 gender-dependent distribution similar to those observed for myofibrillar proteins (see above). In
455 addition, replacement of the unidentified protein by a myofibrillar protein (TRP2 β , ACT, or MLC2)
456 gave the same classification results. This suggests that this protein distinguishes gender according to
457 early *post-mortem* muscle metabolic activity. As the two proteins give complementary information,
458 PRDX6 would thus primarily distinguish rearing environment/gender according to glycolytic capacity
459 of the LL muscle. The correlation between the unidentified protein and PRDX6 is not surprising as

460 these features are related; glycolytic fibres have faster contractile capacity. The positive correlation
461 between PRDX6 levels and glycolytic capacity is, however, surprising. Mitochondria are believed to
462 be the major producers of reactive oxygen species (Chance et al., 1979; Bejma and Ji, 1999) and in
463 trained and untrained rats oxidative fibres had higher antioxidant enzyme activities than glycolytic
464 fibres (Kaczor et al., 2007; Lawler et al., 1994; Laughlin et al., 1990). These studies assessed however,
465 glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase activities, but not PRDX6 levels, a more
466 recently described antioxidant (Wang et al., 2003). It is thus possible that increased PRDX6 levels
467 reflect higher proportions of glycolytic fibres or increased glycolytic activity. In addition, enzyme
468 activities may be unrelated to enzyme levels as shown by the study of Oh-Ishi et al. (1997) on
469 expression, activity and levels of superoxide dismutase in trained and untrained rats.

470

471 *Sire breed*

472 HSP73 allowed correct classification of 21 pigs according to sire breed. HSP73 is described as the
473 constitutively expressed HSP70-isoform as it is present in cells of unstressed rats, while HSP72,
474 earlier identified as a rearing environment-dependent spot (Kwasiborski et al., 2008a), is considered
475 the stress-inducible isoform (Sorger and Pelham, 1987; Hernando and Manson, 1997; Scott et al.,
476 2003). In general, exercise or stress slightly increases HSP73 levels in various tissues, or has no effect
477 (Craig et al., 1983; Hernando and Manson, 1997; Demirel, et al. 1999; Scott et al., 2003; Ramaglia and
478 Buck, 2004). There are, however, exceptions. For example, in rat *soleus* muscle, heat stress increased
479 HSP73 and HSP72 levels similarly (Oishi et al., 2002). Likewise, HSP72 had relatively high
480 constitutively expressed levels in skeletal fibre type I muscles (Locke et al., 1991; Locke et al., 1994;
481 Gonzalez et al., 2000). The present study found 1.6-fold higher HSP73 levels in Duroc compared to
482 Large White sired pigs and an earlier study found 2.3-fold higher HSP73 transcription rates in Duroc
483 compared to Taoyuan *Longissimus* muscles (Lin and Hsu, 2005), warranting further research into the
484 effect of Duroc genes on HSP73 expression. Based on today's knowledge, the dimorphic distribution
485 of HSP73 levels according to sire breed is difficult to interpret. Before and after stress, HSP73 was
486 found throughout the cell with most cytoplasmic immuno-labeling associated with mitochondria
487 (Lithgow et al., 1993). Amounts of other mitochondrial proteins do not differ according to sire breed
488 (Kwasiborski et al., 2008a), suggesting that pigs of different sire breeds have similar amounts of
489 mitochondria. The different HSP73 levels could thus indicate a stronger basal HSP73 chaperone
490 function in Duroc sired compared to Large White sired pigs. Alternatively, as pigs had been active
491 prior to slaughter due to the slaughter procedure, the observed HSP73 levels may reflect the effect of
492 this activation. The dimorphic distribution may thus reflect a stronger activity-induced increase in
493 Duroc sired pigs. Finally, the effect of sire breed may be indirectly due to putative hormonal
494 differences (Foury et al., 2007; Terlouw and Rybarczyk, 2008). Dimorphic differences in HSP70
495 levels have been reported for gender. Female rats had lower basal HSP73 levels in the *soleus* and
496 *extensor digitorum longus* muscles and an attenuated stress-induced HSP72 response in various

497 tissues, compared to male rats (Gonzalez et al., 2000; Nickerson et al., 2006). At least part of these
498 differences was attributed to the effect of estrogens (Paroo et al., 1999; Paroo et al., 2002).

499

500 *Implications*

501 The present study demonstrates that proteins may be used as biomarkers for genetic or rearing
502 background of pigs and thus, that proteins may be suitable for traceability purposes, as an alternative
503 to DNA-based traceability techniques (Dalvit et al., 2007), or as markers for genetic research. Levels
504 of marker proteins may depend on internal and/or external influences. A pre-requisite is that
505 treatment-specific variations in levels of marker proteins resist to additional influences. For example, a
506 marker protein for a genetic trait will be more efficient if it is little or not influenced by rearing
507 conditions or stress reactions at slaughter. In the present study, pigs were reared under different
508 conditions and had, in addition, been selected to vary in pre-slaughter activity and stress levels, as
509 indicated by pre-slaughter glycogen levels and ultimate pH, balanced over the three treatment factors.
510 As mentioned above, the effect of gender on extractability of myofibrillar proteins and Cyt Bc1 levels
511 is most probably secondary to the effect of sex hormones, and results suggest that rearing conditions
512 or stress reactions at slaughter had little impact. Levels of PRDX6, marking rearing environment,
513 depended both on external and internal factors; as it classified only pigs of known gender correctly.
514 The effect of sire breed on HSP73 may be directly related to differences in transcriptional activity, or
515 secondary to other breed differences, due to variations in hormonal or intracellular characteristics or
516 functioning. However, HSP73 of 3 pigs did not follow the observed pattern: a Duroc-sired pig had
517 very low and 2 Large White-sired pigs had relatively high levels. This may indicate additional genetic
518 influences, or environmental effects, due to, for example, different stress reactivity of these pigs.
519 Further studies are needed to increase our understanding of the biochemical causes and consequences
520 of increased or reduced levels of specific proteins between animals of different genetic and rearing
521 backgrounds. For example, it would be of interest to study phenotypic characteristics of Duroc and
522 Large White-sired pigs that have HSP73 levels characteristic of the other cross.

523 **ABBREVIATIONS USED**

524

525 LL, *Longissimus lumborum* muscle; PCA, Principal component analysis; TRP2 β , isoform 2 β of
526 tropomyosin; ACT, Actin; MLC2, Myosin light chain 2; TNT, Troponin T; HSP27, Heat shock
527 protein 27kDa; COF2, Cofilin 2; ENO, Enolase isoforms; cG3PDH, cytosolic Glycerol-3-phosphate
528 dehydrogenase; GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; PKM1, isoform M1 of
529 Pyruvate kinase; TPI, Triosephosphate isomerase; Cyt Bc1, Cytochrome Bc1; ADP, Adenosine
530 diphosphate; ATP, Adenosine triphosphate; PRDX6, peroxiredoxin 6; ppm, Part per million; CBP,
531 Calcium binding protein; bCRYST, -b-crystallin; HSP73, Heat shock protein 73kDa; HSP72, Heat
532 shock protein 72kDa; α PARV, α -Parvalbumin; ALDH9, E3 isoform of Aldehyde dehydrogenase;
533 PRDX6, Peroxiredoxin 6; HSC70, Heat shock cognate 70kDa; MHC, Myosin heavy chain; Unid,
534 Unidentified protein.

535

536

537 **ACKNOWLEDGMENT**

538

539 The present study was financed by INRA (France) and Genus Plc (UK). The authors thank Elisabeth
540 Laville for helpful comments.

541 **REFERENCES**

542

543 Azad, N.S., Rasool, N., Annunziata, C.M., Minasian, L., Whiteley, G., Kohn, E.C., 2006. Proteomics
544 in Clinical Trials and Practice: Present Uses and Future Promise. *Mol. Cell Proteomics* 5, 1819-1829.

545

546 Bejma, J., Ji, L.L., 1999. Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal
547 muscle. *J. Appl. Physiol.* 87, 465-470.

548

549 Bendixen, E., 2005. The use of proteomics in meat science. *Meat Sci.* 71, 138-149.

550

551 Berchtold, M.W., Brinkmeier, H., Müntener, M., 2000. Calcium ion in skeletal muscle: Its crucial role
552 for muscle function, plasticity and disease. *Physiol. Rev.* 80, 1215-1265.

553

554 Bergmeyer, H.U., 1974. *Methods of enzymatic analysis.* Verlag Chemie Weinheim, 2196(3), 1196-
555 1201/1238-1242/1475-1479.

556

557 Bouamrani, A., Ternier, J., Ratel, D., Benabid, A.L., Issartel, J.P., Brambilla E., Berger F. 2006.
558 Direct-Tissue SELDI-TOF Mass Spectrometry Analysis: A New Application for Clinical Proteomics.
559 *Clin. Chem.* 52, 2103-2106.

560

561 Bouley, J., Chambon, C., Picard, B., 2004. Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-
562 dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 4, 1811-1824.

563

564 Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of
565 protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

566

567 Chance, B., Sies, H., Boveris, A., 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol.*
568 *Rev.* 59, 527-605.

569

570 Chin, E.R., 2005. Role of Ca^{2+} / calmodulin-dependent kinases in skeletal muscle plasticity. *J. Appl.*
571 *Physiol.* 99, 414-423.

572

573 Craig, E.A., Ingolia, T.D., Manseau, L.J., 1983. Expression of drosophila heat-shock cognate genes
574 during heat shock and development. *Dev. Biol.* 99, 412-426.

575

576 Dalvit, C., De Marchi, M., Cassandro, M., 2007. Genetic traceability of livestock products : A review.
577 *Meat Sci.* 77, 437-449.

578
579 Demirel, H.A., Powers, S.K., Naito, H., Tumer, N., 1999. The effects of exercise duration on
580 HSP72/73 induction in rats. *Acta Physiol. Scand.* 167, 227-231.
581
582 Estrada, M., Varshney, A., Ehrlich, B.E., 2006. Elevated Testosterone induces apoptosis in neuronal
583 cells. *J. Biol. Chem.* 281, 25492-25501.
584
585 Foury, A., Geverink, N.A., Gil, M., Gispert, M., Hortós, M., Font i Furnols, M., Carrion, D Blott, S.C.,
586 Plastow, G.S., Mormède P. 2007. Stress neuroendocrine profiles in five pig breeding lines and the
587 relationship with carcass composition. *Animal* 1, 973-982.
588
589 Gonzalez, B., Hernando, R., Manso, R., 2000. Stress proteins of 70 kDa in chronically exercised
590 skeletal muscle. *Eur. J. Physiol.* 440, 42-49.
591
592 Hamelin, M., Sayd, T., Chambon, C., Bouix, J., Bibé, B., Milenkovic, D., Leveziel, H., Clop, A.,
593 Marinova, P., Laville, E., 2007. Differential expression of sarcoplasmic proteins in four heterogeneous
594 ovine skeletal muscles. *Proteomics* 7, 271-280.
595
596 Hamelin, M., Sayd, T., Chambon, C., Bouix, J., Bibé, B., Milenkovic, D., Leveziel, H., Georges, M.,
597 Clop, A., Marinova, P., Laville, E., 2006. Proteomic analysis of ovine muscle hypertrophy. *J. Anim.*
598 *Sci.* 84, 3266-3276.
599
600 Hernando, R., Manson, R., 1997. Muscle fibre stress in response to exercise: Synthesis, accumulation
601 and isoform transitions of 70-kDa heat-shock proteins. *Eur. J. Biochem.* 243, 460-467.
602
603 Hwang, I.H., Park, B.Y., Cho, S.H., Kim, M.J., Lee, J.M., 2004. Effects of pre-slaughter fasting and
604 chiller ageing on objective meat quality in Longissimus dorsi, Biceps Femoris and Triceps Brachii
605 muscles of Korean native black pigs. *Anim. Sci. Technol.* 46, 405-414.
606
607 Imai, H., Nakagawa, Y., 2003. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione
608 peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 34, 145-169.
609
610 Jia, X., Hollung, K., Therkildsen, M., Hildrum, K.I., Bendixen, E., 2006. Proteome analysis of early
611 post-mortem changes in two bovine muscle types: M. longissimus dorsi and M. semitendinosus.
612 *Proteomics* 6, 936-944.
613

614 Kaczor, J.J., Hall, J.E., Payne, E., Tarnopolsky, M.A., 2007. Low intensity training decreases markers
615 of oxidative stress in skeletal muscle of mdx mice. *Free Radic. Biol. Med.* 43, 145-154.
616

617 Klug, G., Reichmann, H., Pette, D., 1983. Rapid reduction in parvalbumin concentration during
618 chronic stimulation of rabbit fast twitch muscle. *FEBS Letters.* 152, 180-182.
619

620 Kwasiborski, A., Sayd, T., Chambon, C., Santé-Lhoutellier, V., Rocha, D., Terlouw, C., 2008 a. Pig
621 Longissimus lumborum proteome: Part I: Effects of genetic background, rearing environment and
622 gender. *Meat Sci.* In press.
623

624 Kwasiborski, A., Sayd, T., Chambon, C., Santé-Lhoutellier, V., Rocha, D., Terlouw, C., 2008 b. Pig
625 Longissimus lumborum proteome: Part II: Relationships between protein quantity and meat quality.
626 *Meat Sci.* In press.
627

628 Lametsch, R., Kristensen, L., Larsen, M.R., Therkildsen, M., Oksbjerg, N., Ertbjerg, P., 2006.
629 Changes in the muscle proteome after compensatory growth in pigs. *J. Anim. Sci.* 84, 918-924.
630

631 Laughlin, M.H., Simpson, T., Brown, O.R., Smith, J.K., Korthuis, R.J., 1990. Skeletal muscle
632 oxidative capacity, antioxidant enzymes and exercise training. *J. Appl. Physiol.* 68, 2337-2343.
633

634 Laville, E., Sayd, T., Terlouw, C., Chambon, C., Damon, M., Larzul, C., Leroy, P., Glénisson, J.,
635 Chérel, P., 2007. Comparison of sarcoplasmic proteomes between two groups of pig muscles selected
636 for shear force of cooked meat. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 5834-5841.
637

638 Lawler, J.M., Powers, S.K., Van Dijk, H., Visser, T., Kordus, M.J., Ji, L.L., 1994. Metabolic and
639 antioxidant enzyme activities in the diaphragm: effects of acute exercise. *Respir. Physiol.* 96, 139-149.
640

641 Lin, C.S., Hsu, C.W., 2005. Differentially transcribed genes in skeletal muscle of Duroc and Taoyuan
642 pigs. *J. Anim. Sci.* 83, 2075-2086.
643

644 Lithgow, T., Ryan, M., Anderson, R.L., Hoj, P.B., Hoogenraad, N.J., 1993. A constitutive form of
645 heat-shock protein 70 is located in the outer membranes of mitochondria from rat liver. *FEBS. J.* 332,
646 277-281.
647

648 Locke, M., Atkinson, B.G., Tanguay, R.M., Noble, E.G., 1994. Shifts in type I fiber proportion in rat
649 hindlimb muscle are accompanied by changes in HSP72 content. *Am. J. Physiol.* 266, C1240-C1246.
650

651 Locke, M., Noble, E.G., Atkinson, B.G., 1991. Inducible isoform of HSP70 is constitutively expressed
652 in a muscle fiber type specific pattern. *Am. J. Physiol. Soc.* 261, C774-C779.
653

654 Manevich, Y., Fisher, A.B., 2005. Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant
655 defense and lung phospholipid metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 1422-1432.
656

657 Meunier, B., Bouley, J., Piec, I., Bernard, C., Picard, B., Hocquette, J-F., 2005. Data analysis methods
658 for detection of differential protein expression in two-dimensional gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*
659 340, 226-230.
660

661 Monin, G., Sellier, P., 1985. Pork of low technological quality with a normal rate of pH fall in the
662 immediate post-mortem period: the case of the Hampshire breed. *Meat Sci.* 13, 49- 63.
663

664 Morzel, M., Chambon, C., Hamelin, M., Santé-Lhoutellier, V., Sayd, T., Monin, G., 2004. Proteome
665 changes during pork meat ageing following use two different pre-slaughter handling procedures. *Meat*
666 *Sci.* 67, 689-696.
667

668 Morzel, M., Terlouw, C., Chambon, C., Micol, D., Picard, B., 2007. Muscle proteome is related to
669 meat eating qualities of Longissimus thoracis of "Blonde d'Aquitaine" young bulls: a central role of
670 HSP27 isoforms. *Meat Sci.* 78 (3), 297-304.
671

672 Nickerson, M., Kennedy, S.L., Johnson, J.D., Fleshner, M., 2006. Sexual dimorphism of the
673 intracellular heat shock protein 72 response. *J. Appl. Physiol.* 101, 566-575.
674

675 Oh-ishi, S., Kizaki, T., Izawa, T., Komabayashi, T., Nagata, N., Suzuki, K., Taniguchi, N., Ohno, H.,
676 1997. Effects of endurance training on superoxide dismutase activity, content and mRNA expression
677 in rat muscle. *Clin. Exp. Pharm. Physiol.* 24, 326-332.
678

679 Oishi, Y., Taniguchi, K., Matsumoto, H., Ishihara, A., Ohira, Y., Roy, R.R., 2002. Muscle type-
680 specific response of HSP60, HSP72, and HSC73 during recovery after elevation of muscle
681 temperature. *J. Appl. Physiol.* 92, 1097-1103.
682

683 Okumura, N., Hashida-Okumura, A., Kita, K., Matsubae, M., Matsubara, T., Takao, T., Nagai, K.,
684 2005. Proteomic analysis of slow- and fast-twitch skeletal muscles. *Proteomics* 5, 2896-906

685 Olson, E.N., Williams, R.S., 2000. Calcineurin signalling and muscle remodelling. *Cell.* 101, 689-692.
686

687 Paroo, Z., Dipchand, E.S., Noble, E.G., 2002. Estrogen attenuates postexercise HSP70 expression in
688 skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282, C245-C251.
689

690 Paroo, Z., Tiidus, P.M., Noble, E.G., 1999. Estrogen attenuates HSP72 expression in acutely exercised
691 male rodents. *Eur. J. Physiol.* 80, 180-184.
692

693 Ramaglia, V., Buck, L.T., 2004. Time dependent expression of heat shock proteins 79 and 90 in
694 tissues of the anoxic western painted turtle. *J. Exp. Biol.* 207, 3775-3784.
695

696 Rose, A.K., Hargreaves, M., 2003. Exercise increase Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase II
697 activity in human skeletal muscle. *J. Physiol.* 553, 303-309.
698

699 Rubio-Gayosso, I., Sierra-Ramirez, A., Garcia-Vasquez, A., Martinez-Martinez, A., Munoz-Garcia,
700 O., Morato, T., Ceballos-Reyes, G., 2000. 17- β -estradiol increases intracellular calcium concentration
701 through a short-term and nongenomic mechanism in rat vascular endothelium in culture. *J. Card.*
702 *Pharm.* 36, 196-202.
703

704 Sayd, T., Morzel, M., Chambon, C., Franck, M., Figwer, P., Larzul, C., Le Roy, P., Monin, G., Chérel,
705 P., Laville, E., 2006. Proteome analysis of the sarcoplasmic fraction of pig Semimembranosus muscle:
706 Implication on meat color development. *J. Agric. Food Chem.* 54, 2732-2737.
707

708 Scott, M.A., Locke, M., Buck, L.T., 2003. Tissue-specific expression of inducible and constitutive
709 Hsp70 isoforms in the western painted turtle. *J. Exp. Biol.* 206, 303-311.
710

711 Sladek, N.E., 2003. Human aldehyde dehydrogenases: potential pathological, pharmacological, and
712 toxicological impact. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 17, 7-23.
713

714 Sorger, P.K., Pelham, H.R.B., 1987. Cloning and expression of a gene encoding hsc73, the major
715 hsp70-like protein in unstressed rat cells. *EMBO. J.* 6, 993-998.
716

717 Sudre, K., Cassar-Malek, I., Listrat A., Ueda, Y., Leroux, C., Jurie, C., Auffray, C., Renand, G.,
718 Martin, P., Hocquette, J-F., 2005. Biochemical and transcriptomic analyses of two bovine skeletal
719 muscles in Charolais bulls divergently selected for muscle growth. *Meat Sci.* 70, 267-277.
720

721 Terlouw, E.M.C., Rybarczyk, P., 2008. Explaining and predicting differences in meat quality through
722 stress reactions at slaughter: The case of Large White and Duroc pigs. *Meat Sci.* 79, 795-805.
723

724 Ueda, K., Nakanishi, T., Shimizu, A., Takubo, T., Matsuura, N., 2008. Identification of L-plastin
725 autoantibody in plasma of patients with non-Hodgkin's lymphoma using a proteomics-based analysis.
726 *Ann Clin Biochem* 45, 65-69.

727

728 Wang, X., Phelan, S.A., Forsman-Semb, K., Taylor, E.F., Petros, C., Brown, A., Lerner, C.P., Paigen,
729 B., 2003. Mice with targeted mutation of peroxiredoxin 6 develop normally but are susceptible to
730 oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 278, 25179-25190.

731

732 Yang, J., Xu, G., Zheng, Y., Kong, H., Pang, T., Lv, S., Yang Q., 2004. Diagnosis of liver cancer
733 using HPLC-based metabonomics avoiding false-positive result from hepatitis and hepatocirrhosis
734 diseases. *J Chromatography B* 813, 59-65.

CHAPITRE 4

Gene expression is little influenced by genetic and rearing aspects, but is correlated with variations in pork quality traits.

1 **Gene expression is little influenced by genetic and rearing aspects, but is correlated with**
2 **variations in pork quality traits.**

3
4
5 Anthony KWASIBORSKI¹, Dominique ROCHA^{2b}, Claudia TERLOUW^{1a}

6
7 ¹ UR370 Qualité des Produits Animaux, INRA, F-63122 St Genès Champanelle, France

8 ² Genus plc, Genus Cambridge Research Laboratory, Department of Pathology, University of
9 Cambridge CB2 1QP Cambridge, United Kingdom.

10
11
12
13
14
15
16
17 ^a Corresponding author present address:

18 Terlouw Claudia

19 Institut Nationale de la Recherche Agronomique, UR1213 Herbivores

20 F-63122 Saint-Genès Champanelle, France

21 Tel: +33 (0) 473.62.45.69

22 E-mail: Claudia.Terlouw@clermont.inra.fr

23
24 ^b Dominique Rocha present address:

25 UMR1061 Unité de Génétique Moléculaire Animale

26 Institut Nationale de la Recherche Agronomique

27 Université de Limoges, Faculté des Sciences et Techniques

28 123, Avenue Albert Thomas,

29 87060 Limoges, France

30 Tél : 33 (0)5 55 45 76 55

31

32 **Abstract**

33

34 The present study assessed expression of 10 genes in 24 pig *longissimus* samples earlier
35 subjected to a proteomic study by our group. Genes were selected on the basis of the earlier
36 proteomic results. Using a 2x2x2 factorial experiment, rearing environment (indoors or
37 outdoors), sire breed (Duroc or Large White), and gender (female or castrated male)
38 influenced much less gene expression than protein content. Expression levels of several genes
39 were correlated. Gene expressions were not correlated with levels of their corresponding
40 proteins, but expressions of a significant proportion of the genes were correlated with a
41 significant proportion of proteins. Finally, most meat quality traits were correlated with
42 expression of at least one of the studied genes. The most meaningful of these was the
43 association of a slower and less pronounced pH decline, with lower levels of *HSP72*
44 expression and higher levels of HSP72. These relationships are possibly related to fibre type
45 composition and pre-slaughter stress levels.

46

47

48 **Key words:** Transcriptomic, Proteomic, *Longissimus* muscle, Pigs, Meat quality.

49 **Introduction**

50

51 Transcriptomics is the study of the relative abundance of mRNA, or transcriptome, of
52 identified genes. The transcriptome varies between cell types and according to the
53 biochemical status of the cell. This technology may help to link gene expression or
54 quantitative trait loci (QTL) to a phenotype of interest. For example, in pigs, QTL were
55 identified for chemical body composition traits (Duthie et al., 2008). Similarly, many genes
56 were differentially expressed in white and red muscle fibres (Campbell et al., 2001; Bai et al.,
57 2003) and several genes were differentially expressed in muscles of fast and slow growing
58 Charolais bulls (Sudre et al., 2005). These studies are a step towards a better understanding of
59 underlying physiological mechanisms influencing phenotypic differences. This technology
60 may also help to identify molecular markers of meat sensory quality. In beef, expression of
61 DNAJA1, a gene coding for a heat shock protein, explains 63% of the variability of
62 tenderness (Bernard et al., 2007). In pigs, 12 genes were found to be located in regions
63 previously reported to contain QTL affecting meat tenderness (Lobjois et al., 2008).

64 Proteomics is the study of the relative abundance of a large part of the protein cell content
65 or proteome. Like the transcriptome, the proteome varies between cell types and according to
66 the needs of the cell (Mullen et al., 2006). Proteomic studies identified proteins that play a
67 central role in meat quality, such as colour, drip loss, shear force or tenderness (Kwasiborski
68 et al., 2008 b; Hwang et al., 2004; Sayd et al., 2006; Laville et al., 2007; Morzel et al., 2008).

69 Transcriptomics and proteomics are complementary technologies (Celis et al., 2000).
70 Several studies have applied them to the same samples and found that they are only weakly
71 correlated, indicating that post-translational regulation of gene expression is an important
72 factor in intracellular regulation (Anderson and Seilhamer, 1997; Chen et al., 2002; De Nobel
73 et al., 2001; Izaguirre et al., 1997; Pimenta et al., 2007; Dihal et al., 2007). In contrast, a study
74 on pigs found that expression of types I and IIB myosin Heavy Chain were quite well
75 correlated with their respective proteins contents (Gunawan et al., 2007).

76 In earlier reports we demonstrated that sire breed, rearing environment and gender
77 influenced 111 of 220 matched proteins that levels of 97 proteins were correlated with
78 technological meat quality traits (Kwasiborski et al., 2008 a; b). The present study was
79 designed to determine whether these treatment factors influence expression of corresponding
80 genes. It aimed further to determine relationships between gene expressions and these protein
81 levels and/or meat quality variables. Therefore, we used the same samples to assess

82 expression of several genes. Genes were selected on the basis of the relationship found
83 between the corresponding protein and treatment factors, or between the corresponding
84 protein and meat quality traits.

85

86 **2. Materials and methods.**

87

88 *2.1. Animals, housing and slaughter*

89

90 Ten Large White x Landrace sows have been inseminated with mixed semen from PIC Duroc
91 and Large White sires. From the about 100 piglets, 48 have been selected, based on
92 parenthood and weight. Pigs were born on the site in an outdoor farrowing system. They were
93 weaned at 4 weeks and kept indoors until fattening at 2 months of age. Half of each genetic
94 type was fattened indoors in four 2.2 x 2.9 m pens with slatted floors in a heated and
95 ventilated animal room of 4 x 8.8 m. The other half was fattened outdoors on 850 m² parcels
96 with little grass. Each parcel contained a 7.5 m² hut, a trough, a bowl drinker and a mud hole
97 with water (pool). There were 6 pigs (3 females, 3 castrated males) of a single genetic type to
98 a pen or parcel. Pigs were put into the fattening system in April and slaughtered in October.
99 Outdoor pigs were fed *ad libitum*, indoor pigs were slightly restricted in order to standardise
100 slaughter weight at similar ages. Liquefied food was distributed at 6 and 18 h.

101 Pigs were slaughtered at the age of about 8 months in a small local abattoir after a fasting
102 period of 24 hours. Half of each treatment group was slaughtered after mixing, short transport,
103 and overnight lairage and half immediately following a short transport. They were stunned on
104 the floor with manually operated low voltage tongs. Slaughter took place on two different
105 days, at one-week interval, balanced for gender, housing system and genetic type and
106 slaughter conditions.

107 Five minutes after bleeding, two 5-g samples of the *Longissimus Lumborum* (LL) were
108 excised, introduced into plastic cups and immediately frozen in liquid nitrogen. Upon arrival
109 at the laboratory, the cups were stored at -80°C until use for proteomic (Kwasiborski et al.,
110 2008 a; b) and transcriptomic analyses (present study).

111 A number of technological meat quality-related measurements were carried out. A 2-g LL
112 sample was taken 45 min after bleeding and immediately homogenised in 18 ml of 5mM
113 iodoacetate to measure pH (pH 45min; glass electrode: Inlab 427, Mettler Toledo, Greifensee,
114 Switzerland, connected to a portable pH meter: Schött-Geräte, Germany). Twenty-four h after

115 slaughter pH (pH 24h) was measured directly in the LL. Forty-five min and 24 h post-mortem,
116 1-g samples were taken from the LL, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -
117 80°C until assaying of lactate (Lact 45min and Lact 24h) and glycogen (Glyco 45min and
118 Glyco 24h) contents.

119 Muscle temperatures of the LL were measured at 15 and 45 min and 24 h after bleeding (T
120 15min, T 45min and T 24h) using a thermocouple (98004PK) connected to an electronic
121 thermometer (Sefram 9810, St-Etienne, France). Twenty-four h post-mortem, redness (a*),
122 yellowness (b*) and lightness (L*) were recorded directly on the tissue of the muscle using a
123 Minolta Chromameter (CR-300, Minolta Corp., Osaka Japan) equipped with a 0° viewing
124 angle and using illuminant C. To evaluate drip loss, a 2-cm-thick slice of the LL has been cut
125 on the level of the last rib 24 h after slaughter, suspended in a plastic bag and left at 4°C
126 (Honikel, 1998). The amount of water lost was measured 72 (drip loss d3) and 120 hours later
127 (drip loss d5) and expressed as a percentage of the initial sample weight.

128

129 *Glycogen and lactic acid assays*

130 About 200 mg of lyophilised muscle was ground and suspended in 10 ml of perchloric acid
131 0.5 M. After hydrolysis of the glycogen by amyloglucosidase (Bergmeyer, 1974), glucose
132 content of the homogenate was determined. Lactic acid was determined on the supernatant
133 after centrifugation (20 min at 2500 g) of the perchloric homogenate following Bergmeyer's
134 (1974) procedure.

135 Glycolytic potential (GP), the sum of compounds likely to produce lactic acid *post-mortem*,
136 was calculated using the formula proposed by Monin and Sellier (1985). Concentrations are
137 expressed as μmol lactate equivalents/ g of fresh tissue.

138

139 Only 24 pigs were used for the present study. Pigs were selected according to their
140 glycolytic potential and ultimate pH ($r = -0.60$, $p < 0.0001$). Males and females were
141 represented with different symbols in a scatter plot and the 3 higher and 3 lower values were
142 selected for each genetic type and each rearing system, while balancing for gender.

143

144

145

146

147

Table 1. Primers used for real-time PCR

Gene	Accession number	Primer name	Sequence (5' – 3')	Product size (bp)
<i>HPRT</i>	NM001032376	HPRT-F	CCATCACATCGTAGCCCTCTG	172
		HPRT-R	TACTTTTATATCGCCCGTTGACTG	
<i>PPIA</i>	AY266299	PPIA-F	GTCTCCTTCGAGCTGTTTGCAG	245
		PPIA-R	CCAGCATTGCCATGGAC	
<i>28S rRNA</i>	DQ297674	28S-F	ACGGTAACGCAGGTGTCCTA	192
		28S-R	CAAGCCAGTTATCCCTGTGG	
<i>AK1</i>	DQ529281	AK1-F	CCATGGTGGCCAAAGTAGAT	204
		AK1-R	TGATGGTCTCTTCGTTGTCG	
<i>ACY1</i>	D13514	ACY-F	GACGCTCTCCGTCAGTACC	212
		ACY-R	CCACATCTGTGTGGGAGTTG	
<i>MB</i>	M14433	MB-F	GGATGAGATGAAGGCCTCTG	187
		MB-R	AACCTGGATGATGGCTTCTG	
<i>CKM</i>	AY754869	CK-F	CTCATCGACGACCACTTCTCT	181
		CK-R	TCATGTTGCCTCCTTTCTCC	
<i>GAPDH</i>	AF017079	GAPDH-F	ATGCCTCCTGTACCACCAAC	183
		GAPDH-R	AAGCAGGGATGATGTTCTGG	
<i>ANXA2</i>	AY706383	ANXA-F	CTACAGCCCCTATGACATGC	150
		ANXA-R	GTGGCTTGTTCTGAATGCAC	
<i>TPI</i>	DQ437525	TPI-F	TTTTCGAGCAAACCAAGGTC	150
		TPI-R	GGACAACCTTGTTCCAGTCC	
<i>GDI2</i>	AY553929	GDI-F	CCCAAGTTCCTCATGGCTAA	215
		GDI-R	TTGGCAACATACACCAGGAA	
<i>HSP72</i>	AY466608	HSP70-F	TGCTGATCCAGGTGTACGAG	204
		HSP70-R	CGTTGGTGATGGTGATCTTG	
<i>MDH</i>	U44846	MDH-F	AACCCAGCCAATACCAACTG	207
		MDH-R	CTTGGCATGGTTGACATCTG	

148 2.2. *Gene expression study*

149

150 *RNA extraction*

151 RNA extraction was carried out using RNeasy Midi Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Sixty-
152 five µl of Proteinase K (Qiagen) were added to 150 mg of homogenized muscle and incubated
153 at 55°C for 20 min. The homogenate was centrifuged (5 min, 3000g) and 0.5 volume of
154 ethanol was added to the supernatant. RNA were fixed on a column (Qiagen Midi Kit) and
155 washed by 2 ml of RW1 buffer. After centrifugation (5 min 3000g) 20 µl of DNase I (Qiagen)
156 were added on the column for 15 min and washed once by 2 ml of RW1 buffer and twice with
157 2.5 ml of RPE buffer (Qiagen). Extracted RNA were eluted from the column in 250 µl of
158 RNase-free water and frozen at -70°C until use.

159

160 *RNA quality verification*

161 RNA quality was tested using a RNA Labchip kit and the Agilent 2100 Bioanalyzer
162 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). A RNA 6000 Nanochip was filled with a mix
163 of 65 µl gel matrix and 1 µl of dye (Agilent Technologies). One µl of denatured (2 min, 70°C)
164 RNA 6000 ladder and 1 µl of RNA extraction were put into the RNA Nano Chip. The
165 28S/18S ribosomal RNA (rRNA) ratio was performed for each RNA extraction using the
166 2100 expert software (Agilent Technologies). Extractions containing 28S/18S ribosomal RNA
167 fractions lower than 1/1 were re-extracted and verified again before further assaying.

168

169 *Quantitative Polymerisation Chain Reaction Primers design*

170 Oligonucleotide primers were designed with an optimal annealing temperature (T_m) of
171 60°C, an amplified fragment size of 200 bp using the Primer 3 software
172 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) and containing an intron. The
173 specificity of each primer pair was verified by performing a Blast search
174 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) on all mammalian organisms in the database and
175 subsequently tested biochemically using a classical PCR and genomic DNA. Finally, cDNA
176 amplified fragments were sequenced to verify similarity with the theoretical sequence. Primer
177 details are shown in table 1.

178

179

180

181

182 *Quantitative real-time Reverse Transcription Polymerisation Chain Reaction*

183 Real-time Reverse Transcription Polymerisation Chain Reaction (qRT-PCR) was carried
184 out using a MyiQ Single-Colour Real-Time PCR Detection System (Biorad, Hercules, USA)
185 and 96-well microtiter plates. For each reaction, a mix was prepared according to the
186 Quantitec SYBR Green RT-PCR Master Mix protocol (Biorad). Briefly, 100 ng of RNA were
187 combined to 12.5 µl of RT-PCR master mix, 0.25 µl of Quantitect RT mix and 25 µM of
188 forward and reverse primers. Three wells were negative controls (containing the mix without
189 RNA). After reverse transcription of 30 min at 50°C, polymerase was activated by a first step
190 of 5 min at 95°C. Quantitative RT-PCR runs were composed of 40 cycles of 4 steps: 15 s at
191 94°C for denaturation, 30 s at 55°C for hybridation of the primers, 30 s at 72°C for elongation
192 and a final step of 10 s at 77°C for fluorescence measurements. Number of cycles to reach a
193 fluorescent threshold was used to determine the Crossing point (Cp) for each gene and each
194 sample. Samples were assayed in triplicate and average Cp's were used for analysis. Each
195 micro-plate contained 3 different primers for each of the 24 samples. Triplicates were
196 balanced over the microtiter plates.

197 In order to determine specificity of PCR amplification, melting curve data were collected at
198 a temperature increase from 55 to 98°C with continuous fluorescence measurements followed
199 by cooling to 4°C.

200

201 *2.3. Statistical analysis.*

202

203 Normal distribution of gene expression was verified using the Shapiro-Wilk test and genes
204 with abnormal distributions were normalised using the Box-Cox procedure.

205 Statistical procedures and analysis were carried out using the XLstat addinsoft version
206 7.5.3 (Microsoft Corporation, Seattle, USA). Intensity-dependent normality of the distribution
207 was verified according to Meunier et al. (2005). The main and second degree interactive
208 effects of rearing method, genetic background and gender on gene expression were tested for
209 significance at the 5 % level by a 3-way ANOVA. One-sided binomial comparisons were
210 further used to compare proportions of proteins (Kwasiborski et al., 2008 a) and gene
211 expressions (present study) influenced by treatment factors.

212 To study relationships between gene expressions and proteins levels and between gene
213 expression and meat quality traits, Pearson correlations were calculated if variables were not

Table 2. Correlations between meat quality parameters and corresponding spot of protein of the studied genes according to subgroup.

Group	Protein name	Protein function	Correlated meat quality	Pearson value	p-value
All pigs	ACY1	Amino acids metabolism	pH 45min Temperature 45min	0.86 -0.87	0.03 0.02
	GDI2	Formation and transport of vesicles	pH 45min a*	-0.91 -0.91	0.01 0.01
Castrated male	CKM	Synthesis or degradation of phosphocreatine	a*	-0.60	0.04
	HSP72	Involve in oxidative stress	Thawing loss	-0.61	0.03
	MB	Oxygen transport	Thawing loss	-0.72	<0.01
Female	AK1	Synthesis of ATP and AMP from 2 ADP	pH 24h	0.58	0.05
			Gycogen 45min	-0.67	0.02
			Glycogen 24h	-0.78	<0.01
	ANXA2	Membrane organisation	Thawing loss	-0.64	0.03
	CKM	Synthesis or degradation of phosphocreatine	Drip loss d5	0.62	0.04
	GAPDH	5th glycolysis enzyme	pH 24h	0.67	0.02
Glycolytic potential			-0.65	0.02	
TPI	4th glycolysis enzyme	Glycogen 24h	0.67	0.02	
		L*	0.59	0.05	
Large White sire	ANXA2	Membrane organisation	Thawing loss	-0.59	<0.01
			a*	-0.58	0.05
	HSP72	Involve in oxidative stress	Thawing loss	-0.67	0.02
	MDH	Before last citric acid cycle enzyme	Glycogen 45min	0.58	0.05
			Thawing loss Cooking loss	0.68 0.59	0.02 0.04
TPI	4 th glycolysis enzyme	Thawing loss	0.64	0.03	
Duroc sire	HSP72	Involve in oxidative stress	pH 24h	-0.77	<0.01
Outdoors	HSP72	Involve in oxidative stress	L*	-0.62	<0.01
	MB	Oxygen transport	L*	-0.74	<0.01

215 influenced by treatment factors. One sided binomial comparisons were made to determine
216 whether proportion of proteins correlated with expression of a given gene was greater than
217 expected by chance (5%). If the correlation between a meat quality trait and gene expression
218 depended on a treatment factor, analysis of covariance was used to correct for the effect of the
219 treatment factor. Correlations were considered per treatment group if they were influenced by
220 treatment factor (i.e. if the analysis of covariance was not significant). If a meat quality trait
221 was found to be correlated with the expression of a gene, the corresponding protein was added
222 to the model.

223 When multiple correlations were found between several variables (gene expression, protein
224 levels, and/or meat quality traits), Principal component analysis (PCA) plots were made to
225 represent relationships graphically.

226

227 **3. Results and Discussion**

228

229 *Gene selection*

230 In the proteomic study, of the 220 matched proteins, 111 were influenced by one or
231 several treatment factors, and 97 correlated with one or more meat quality traits (Kwasiborski
232 et al., 2008 a; b). Of 22 of the corresponding genes the DNA sequence was known. We
233 successfully designed primers for 10 of the 22 pre-selected genes (Table 2).

234 Three housekeeping genes were used as standards to compare gene expression between
235 samples. Hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) is implicated in the purine
236 metabolism (Shirley et al., 2007) and the corresponding gene was earlier used as standard by
237 Pfeffer et al. (Pfeffer et al., 2005) who studied the influence of different diets on β -oxidation
238 in pig liver and muscle. Cyclophilin (PPIA) is the cytosolic receptor for cyclosporin A
239 possessing peptidyl-prolyl isomerase activity which is essential for protein folding and
240 conformational change in vivo (Chen et al., 2004) and the corresponding gene was earlier
241 used as standard by Collins et al. (Collin et al., 2000) who studied gestational changes in L-
242 type Calcium channel expression in uterine muscle of guinea pig. Finally, 28S rRNA (28S) is
243 implicated in protein synthesis and the corresponding gene is a frequently employed standard
244 (Denz and Dube, 2005).

245 Level of gene expression of the HPRT standard was closest to the expression of genes
246 studied in the different samples, and its standard error was smallest. Consequently, this
247 standard was selected for further use. Its Cp was determined for each sample (Cp-standard).

248 For each sample and each gene, the Cp was divided by the Cp-standard to normalise values.
249 Obtained values will be referred to as 'gene expression' hereafter.

250 For each gene, melting curves were similar across samples, indicating specificity of
251 primers and amplification. Similarly, no amplification was observed for the negative controls,
252 indicating absence of contamination.

253 *CKM* and *AK1* code for cytoplasmic muscular creatine kinase (**CKM**) and for adenylate
254 kinase 1 (**AK1**), both involved in the transfer of phosphor. CKM catalyses reversibly the
255 transfer of phosphate between ATP and various phosphogens such as creatine phosphate. AK1
256 is an adenylate kinase isoform, catalysing the interconversion of two ADPs to an ATP and an
257 AMP. AK1 is a key enzyme in the maintenance of intracellular adenine nucleotide ratios. Like
258 CKM, AK1 is highly expressed in the cytosol of muscle cells, in contrast to AK2 and AK3 are
259 restricted to the intermembrane space and the mitochondrial matrix, respectively, of various
260 tissues (Heil et al., 1974; Janssen et al., 2003; Dzeja et al., 2003). Several of the studied genes
261 are related to carbohydrate energy metabolism. Triosephosphate isomerase (**TPI**) catalyses the
262 reversible interconversion of dihydroxyacetone phosphate and glyceraldehyde-3-phosphate in
263 the glycolytic pathway. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (**GAPDH**) is the sixth
264 enzyme in the glycolytic pathway converting reversibly glyceraldehyde-3-phosphate into 1,3-
265 biphosphoglycerate. GAPDH has, however, other important functions, including protection
266 against oxidative stress (Sirover, 1999). Cytoplasmic malate dehydrogenase (**cMDH**) shows
267 higher expression levels in red, than white fibres (Campbell et al., 2001) and converts
268 oxaloacetate into malate and isocitrate dehydrogenase. It allows simultaneously the oxidation
269 of NADH,H^+ into NAD^+ and its presence is therefore important for glycolysis (Hayes et al.,
270 1987). The remaining genes code for proteins belonging to various pathways. Heat Shock
271 Protein 72kDa (**HSP72**) is described as the stress-inducible HSP70-isoform as it is present in
272 cells of stressed rats, in contrast to HSP73, considered as the constitutively expressed HSP70
273 isoform (Scott et al., 2003; Hernando and Manson, 1997; Sorger and Pelham, 1987). Isoform
274 A2 of annexin (**ANXA2**) binds to phospholipids and F-actin molecules of the cytoskeleton in
275 the presence of Ca^{2+} and is involved in many membrane-related functions. It appears further to
276 be involved in translation as it binds mRNA associated with cytoskeleton-bound polysomes
277 (Hollas et al., 2006; Filipenko and Waisman, 2003; Filipenko et al., 2004; Aukrust et al.,
278 2007; Vedeler and Hollas, 2000). Isoform 2 of guanosine diphosphate dissociation inhibitor
279 (**GDI2**) is an essential regulator of Rab protein involved in formation and transport of vesicles
280 (Pylypenko et al., 2006). Many proteins of the eukaryotic cells are N-terminal acylated to

Table 3. Pearson and p-values obtained by correlations between genes all animals confounded.

	ACY	AK1	ANXA2	CKM	GAPDH	GDI2	HSP70	MB	MDH	TPI	
ACY		0.04	0.15	0.51	0.05	0.12	0.83	0.73	0.08	0.12	p-value
AK1	-0.42		0.10	0.02	0.42	0.50	0.06	0.57	0.07	0.77	
ANXA2	0.31	-0.35		0.46	0.59	0.19	0.14	0.57	0.24	0.97	
CKM	-0.14	0.48	-0.16		0.02	0.74	0.63	<0.01	0.96	0.63	
GAPDH	0.41	0.17	-0.12	0.47		0.43	0.85	0.10	0.35	<0.01	
GDI2	-0.33	-0.15	0.28	-0.07	-0.17		0.09	0.45	0.45	0.36	
HSP70	-0.05	-0.39	0.31	-0.10	0.04	0.35		0.31	0.62	0.29	
MB	0.07	0.12	0.12	0.56	0.34	0.16	0.22		0.16	0.24	
MDH	0.36	-0.37	0.25	0.01	0.20	0.16	0.11	0.30		0.61	
TPI	0.33	0.07	0.01	0.11	0.56	-0.20	0.23	0.26	0.11		

Pearson value

282 protect them from proteolytic degradation by aminopeptidases. Aminoacylase 1 (**ACY1**) is the
283 most abundant isoform of the aminoacylases, a class of enzymes involved in hydrolysis of *N*-
284 acetylated proteins (Persson et al., 1985; Perrier et al., 2005; Sass et al., 2006). Finally,
285 myoglobin (**MB**) is an oxygen storage protein, of which levels depend strongly on muscle
286 fibre type composition (Lawrie, 1953; Hendricks et al., 1971).

287

288 *Factors influencing gene expression.*

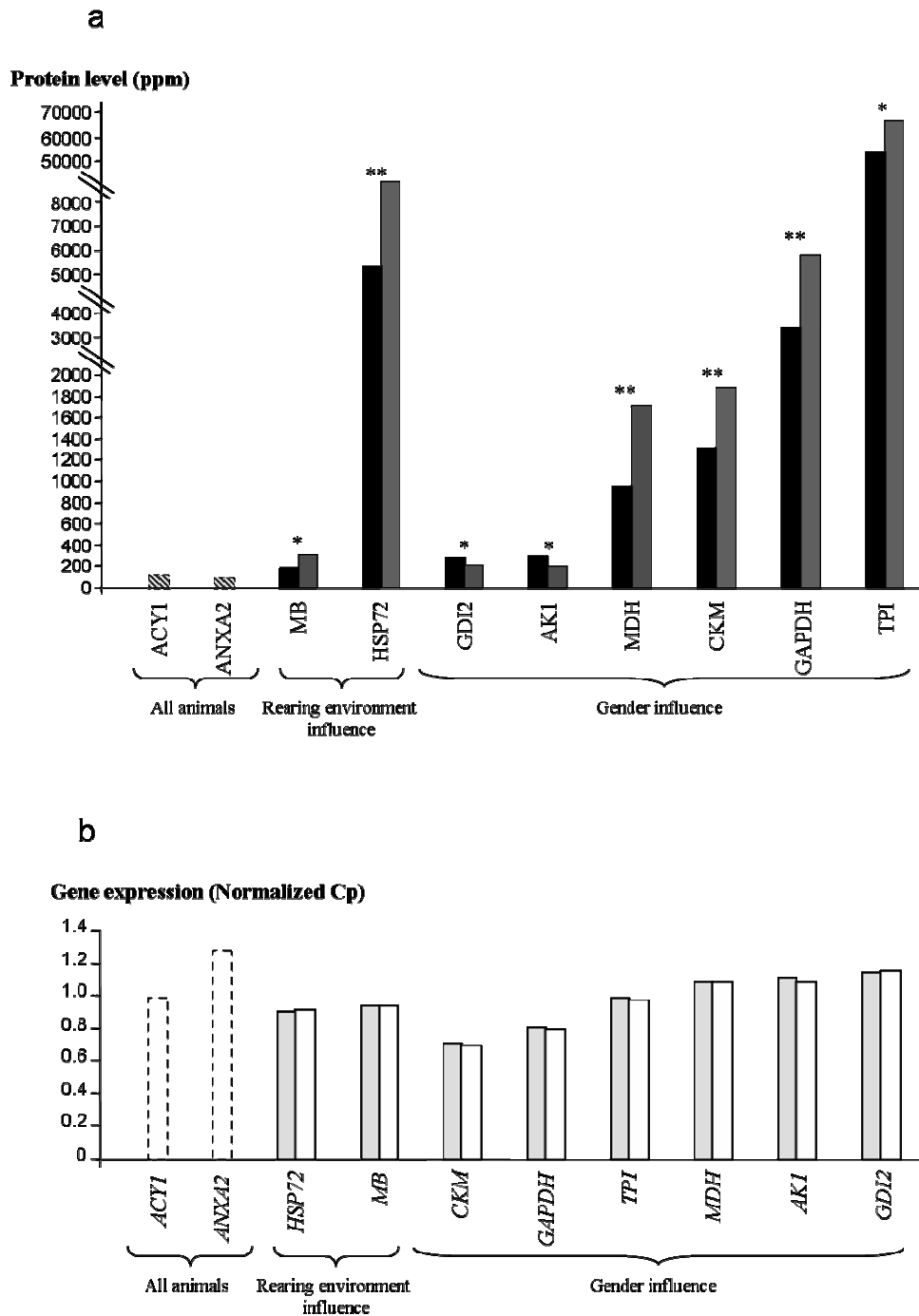
289 Six significant correlations were found between expressions of various genes, including
290 *ACY1*, *AK1*, *CKM*, *GAPDH*, *TPI*, and *MB* (Table 3), which is significantly (binomial one-
291 sample test $p=0.01$) more than expected at the 5% level. With exception of *ACY1*, these genes
292 code for proteins directly or indirectly involved in energy metabolism or phosphor-transfer,
293 suggesting a functional relationship between expressions of these different genes.
294 Transcription of these genes does not rely on the same promoter. While their chromosome
295 position in the pig genome is unknown, in the human genome, although *GAPDH* and *TPI* are
296 on the same chromosome (chromosome 12), *AK1*, *CKM*, and *MB* are on different
297 chromosomes (chromosome 1, 19, 22 respectively). The positive correlation between
298 expression levels of these genes suggest that transcription rates of these genes rely on the
299 same or related activating and/or inhibiting proteins.

300 Analysis of variance found nearly significant different ($p=0.06$) *MB* expression levels
301 between females (0.95 ± 0.02) and castrated males (0.93 ± 0.02) and ($p=0.07$) *TPI* expression
302 levels between indoor (0.97 ± 0.03) and outdoor pigs (1.00 ± 0.03). Expression of the other
303 genes were not influenced by rearing environment, sire breed or gender, or their 2-way
304 interactions ($p>0.11$). In the proteomic analysis of these same pigs, 111 out of 220 matched
305 proteins received a main effect of at least one of the treatment factors at the $p<0.05$ level
306 (Kwasiborski et al., 2008 a; Fig. 1), which is much higher (binomial one-sample test $p<0.001$)
307 than the score of two out of 10 genes. Thus, while 50.5% of the matched proteins were
308 influenced by treatment factors (Kwasiborski et al., 2008 a), expression of only two out of 10
309 genes were *TPI* and *MB*, and only near-significantly.

310 These results show that effects of treatment factors on gene expression were less
311 pronounced than on protein levels and indicate a relative lack of relationships between gene
312 expression and levels of the corresponding protein. It suggests that the earlier observed
313 treatment effects on protein levels occur mainly though post-translational processes. In
314 accordance with this, analyses of covariance found that only levels of two *GAPDH*-isoforms

315 Fig. 1. Comparison of a) protein levels and b) gene expression according to treatment factors
 316 when protein is influenced. For all animals, protein levels were represented by a hatched
 317 discontinuous squares and gene expressions by a discontinuous squares. For influenced
 318 proteins, protein levels were represented by dark grey squares (castrated males and indoors) or
 319 black squares (females and outdoors) and gene expressions by white squares (castrated males
 320 and indoors) or by grey squares (females and outdoors).
 321 * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$; p-value derived from the analysis of variance.

Figure 1



322 were near-significantly ($p=0.06$ and $p=0.08$) negatively correlated with *GAPDH* expression.
323 These isoforms expressed increased metabolic and/or contractile activity, as they were
324 negatively correlated with proteins expressing reduced metabolic and/or contractile activity
325 (Kwasiborski et al., 2008 a). The other two *GAPDH* isoforms were not ($p>0.53$) correlated
326 with expression of the *GAPDH* gene.

327 These results are in accordance with other studies that show that gene expression and
328 corresponding protein levels are often poorly correlated (Izaguirre et al., 1997; De Nobel et
329 al., 2001; Chen et al., 2002). A study in yeast showed, however, that correlations are stronger
330 for more abundant proteins (Gygi et al., 1999). Myosin Heavy Chain (MyHC) is an abundant
331 contractile protein in muscle, representing around 20% of total protein content (Everett et al.,
332 1983; MAnabe et al., 1995) and in accordance with the above study Gygi et al. (1999), in
333 porcine skeletal muscle, expression levels of types I and IIB *MyHC* were correlated with
334 tissue content of the corresponding proteins (Gunawan et al., 2007).

335 The present study found a negative correlation between *GAPDH* expression and *GAPDH*
336 levels, while the correlations in the above studies (Gunawan et al., 2007; Gygi et al., 1999)
337 were positive. An explanation may be that these studies concerned proteins that are
338 constitutively expressed at steady rates. *GAPDH* levels may vary according to metabolic
339 requirements of the cell (Mozdziak et al., 2003). Samples were obtained early *post-mortem*,
340 and probably reflect biochemical status of the cell just before slaughter. The negative
341 correlation between the *GAPDH* isoform may reflect a negative feed-back mechanism related
342 to down-regulation of *GAPDH* expression at the time of sampling, as metabolic requirements
343 were probably higher during the earlier stages of the slaughter procedure where physical effort
344 was increased, for example during loading, transport and unloading. *Post-mortem* pH
345 evolution supports the hypothesis that stress was higher at the earlier stages of slaughter.
346 Ultimate pH values varied between 5.3 and 6.3, indicating that at least some pigs had suffered
347 serious stress at some stage of the slaughter procedure, leading to reduced muscle glycogen
348 content and higher ultimate pH (Bendall, 1973; Terlouw et al., 2005). Forty-five minutes *post-*
349 *mortem*, pH values were between 6.3 and 6.9 thus not showing accelerated pH decline,
350 suggesting that at the later stages of slaughter excessive stress was avoided.

351 To attempt to identify proteins related to the expression of these genes, other than the
352 corresponding proteins, we determined whether gene expressions were correlated with levels
353 of proteins of these same pigs. Expressions of *CKM* and *GAPDH*, were correlated with 10 and
354 12 proteins out of the 109 proteins that were not influenced by treatment factors, respectively.

Table 4. Significant correlations between gene expression and intensity of proteins not influenced by treatment factors.

Gene	Correlated protein	Pearson value	p-value
ANXA2	Unidentified protein (4114)	0.50	0.01
	Unidentified protein (5123)	-0.54	<0.01
	Phosphatidylethanolamin binding protein	-0.53	<0.01
	Phosphoglucomutase 1	-0.50	0.01
	Carbonic anhydrase 3	-0.48	0.02
	Unidentified protein (3003)	-0.46	0.02
	Unidentified protein (1116)	-0.44	0.03
	Peroxiredoxin 6	-0.43	0.04
	Aldhyde dehydrogenase E3	-0.41	0.05
CKM	Unidentified protein (6309)	0.49	0.01
	Unidentified protein (8002)	0.46	0.02
	Unidentified protein (1426)	0.45	0.03
	Unidentified protein (1022)	0.43	0.04
	Transferrin	-0.64	<0.01
	Unidentified protein (4115)	-0.57	<0.01
	Glutathione transferase pi 2	-0.49	0.01
	Unidentified protein (6115)	-0.49	0.02
	Unidentified protein (6118)	-0.44	0.03
Unidentified protein (1004)	-0.41	0.05	
GAPDH	Unidentified protein (8002)	0.62	<0.01
	Unidentified protein (6121)	-0.58	<0.01
	S-Adenosylhomocysteine hydrolase	-0.57	<0.01
	Unidentified protein (6118)	-0.54	0.01
	Unidentified protein (6124)	-0.53	<0.01
	Unidentified protein (6120)	-0.52	<0.01
	Unidentified protein (4115)	-0.51	0.01
	Unidentified protein (6115)	-0.50	0.01
	Unidentified protein (5108)	-0.49	0.02
	Unidentified protein (4113)	-0.48	0.02
	Glutathione transferase pi 2	-0.47	0.02
Unidentified protein (6309)	0.46	0.02	

Table 5. Pearson and p-values obtained by correlation between meat quality traits all animals confounded.

	45min		24h		Water loss			Colour			
	pH	Glycolytic potential	pH	Glycolytic potential	Drip loss d3	Drip loss d5	Thawing loss	Cooking loss	L*	a*	b*
Glycolytic potential	-0.54	<0.01	<0.01	<0.01	0.28	0.17	0.35	0.08	<0.01	<0.01	0.01
pH	0.55	-0.78			<0.01	0.02	<0.01	0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Drip loss d3	-0.23	0.35	-0.64			0.03	<0.01	0.24	0.12	0.47	0.27
Drip loss d5	-0.30	0.23	-0.47		0.45		0.24	0.94	0.41	0.80	0.85
Thawing loss	-0.20	0.57	-0.77		0.60	0.26		0.02	0.03	0.09	0.08
Cooking loss	-0.36	0.49	-0.51		0.26	0.02	0.47		<0.01	0.06	0.02
L*	-0.61	0.86	-0.69		0.33	0.18	0.45	0.54	<0.01	<0.01	<0.01
a*	-0.64	0.63	-0.52		0.16	-0.06	0.35	0.39	0.66		<0.01
b*	-0.51	0.75	-0.61		0.24	0.04	0.36	0.49	0.84	0.83	

p-value

Pearson value

355

356 Several of these were shared in common (Table 4), giving an explanation for the correlation
357 between expression levels of these genes. In addition, *ANXA2* expression was correlated with
358 9 proteins (Table 4). This is near-significantly (9 correlations: binomial one-sample test
359 $p < 0.10$) or significantly (≥ 10 correlations: binomial one-sample test $p < 0.05$) more than
360 expected at the 5% level. In addition, 3 out of 10 genes represent a greater (binomial one-
361 sample test $p = 0.01$) proportion than expected at the 5% level. For each of the 7 other genes,
362 number of significant correlations found were 5 or less, that is, not more than expected at the
363 5% level.

364 These results show that for a significant proportion of the genes, expression was related to
365 levels of various proteins. Unfortunately, most of the proteins correlated with expression of
366 *CKM*, and *GAPDH* as well as of *ANXA2*, were unidentified by mass spectrometry and these
367 relationships are therefore difficult to interpret.

368

369 *Relationships between gene expression, protein levels and meat quality.*

370 The classical correlations between the different meat quality variables were found. Briefly,
371 GP and pH 45 min *post-mortem* were correlated with pH 24 h *post-mortem*, and pH 24 h *post-*
372 *mortem* was correlated with water holding capacity measurements and colour parameters
373 (Table 5). It is well known that at reduced GP, ultimate pH is often higher and that ultimate
374 pH may influence water holding capacity and meat colour (Bendall, 1973; Renerre, 1990; El
375 Rammouz et al., 2004; Huff-Lonergan and Lonergan, 2005), explaining at least partly the
376 correlations between GP, certain water holding capacity measurements, and colour
377 parameters.

378 Expression levels of *HSP72* were significantly correlated with pH 45 min and 24 h *post-*
379 *mortem*, and colour parameters. *GDI2* expression was correlated with pH 24 h *post-mortem*
380 and thawing loss. *ANXA2* expression was correlated with GP and lightness (Table 6). We
381 determined subsequently for these meat quality traits whether inclusion of levels of the protein
382 coded for by the gene, into the model was significant. Analyses of covariance were used to
383 correct for treatment effects. Significant models were found for pH 45 min and 24 h *post-*
384 *mortem*, and thawing loss explaining between 31.8 and 54.7% of variability (Table 7). Where
385 needed, analyses of covariance were used to correct for treatment effects. In all models, gene
386 expression influenced the meat quality variable in the opposite direction as protein expression.
387 Thus, low levels of *HSP72* expression and high levels of *HSP72* predicted higher early *post-*

Table 6. Correlations between gene expressions and meat quality parameters, all animals confounded (ie. no treatment effects on correlations).

		Gene	Pearson value	p-value
45min	pH	<i>HSP72</i>	-0.62	<0.01
	GP	<i>ANXA2</i>	0.48	0.02
24h	pH ¹	<i>GDI2</i>	-0.45	0.03
		<i>HSP72</i>	-0.45	0.03
Water loss	Drip loss d3			
	Drip loss d5			
	Thawing loss ²	<i>GDI2</i>	0.35	0.05
	Cooking loss			
Colour	L*	<i>ANXA2</i>	0.44	0.03
		<i>HSP72</i>	0.50	0.01
	a*	<i>HSP72</i>	0.60	<0.01
	b*	<i>HSP72</i>	0.52	<0.01

¹ Analyses of co-variance with gender as treatment factor and gene expressions (*HSP72* and *GDI2*) as quantitative variables.

² Analysis of co-variance with gender and sire breed as treatment factors and gene expression (*GDI2*) as quantitative variable.

Table 7. Equations of multiple regression models including correlated genes with meat quality traits and corresponding proteins.

	r, p protein	Formula	Percentage explained
pH 45min	0.54, <0.01	$6.04 - 4.08 \text{ HSP72} + (3.73/10000) \text{ HSP72}$	54.7
pH 24h ¹	0.21, NS	$5.01 - 3.64 \text{ HSP72} + (4.56/10000) \text{ HSP72}$	40.9
Thawing loss ¹	0.27, NS	$-48.75 + 57.01 \text{ GDI2} - (1.69/100) \text{ GDI2}$	31.8

¹Residuals were used to correct for treatment effects

388 *mortem* and high ultimate pH (Fig. 2), and low levels of *GDI2* expression and high levels of
389 *GDI2* predicted higher thawing losses. *HSP72* and *GDI2* levels were also directly correlated to
390 pH or thawing loss residuals (e.g. pH 45 min *post-mortem*: $r=0.54$; $p<0.01$). The similarity
391 between the regression models for pH 45 min and pH 24 h *post-mortem* is explained by the
392 correlation between the two pH measurements: high early *post-mortem* pH predicted high
393 ultimate pH.

394 A PCA plot of Figure 3 presents graphically the association between pH, colour
395 parameters, *HSP72* expression and *HSP72* content. *HSP72* is described as the stress-inducible
396 *HSP70*-isoform as it is present in cells of stressed rats, in contrast to *HSP73*, considered as the
397 constitutively expressed *HSP70* isoform (Scott et al., 2003; Hernando and Manson, 1997;
398 Sorger and Pelham, 1987). High levels of *HSP72* may thus reflect higher stress levels during
399 the pre-slaughter procedure, and be an indicator for reduced pre-slaughter muscle glycogen
400 levels, resulting in a reduced pH decline (Figs. 2 and 3; Bendall, 1973). The opposite
401 contributions of *HSP72* content and *HSP72* expression to *post-mortem* pH decline is,
402 however, more difficult to explain. It might reflect a slowing of the metabolic activity and
403 transcription rates of the cell at later compared to earlier stages of slaughter, as suggested
404 above, due to higher activity and/or stress levels at the earlier stages of the slaughter
405 procedure. The relationship between *HSP72* content and ultimate pH may also be related to
406 fibre type. *HSP72* content was found to be proportional to slow-oxidative (red) fibre type
407 content of the muscle (Locke et al., 1991; Locke et al., 1994; Gonzalez et al., 2000), and *post-*
408 *mortem* pH decline is generally less in red fibres (Laborde et al., 1985, Monin et al., 1987).
409 This is, however, not coherent with the negative relationship between *HSP72* content and a^*
410 values (Fig. 3). Results of the present study indicate that *HSP72* expression, rather than
411 *HSP72* levels, was higher in muscles with more red fibres.

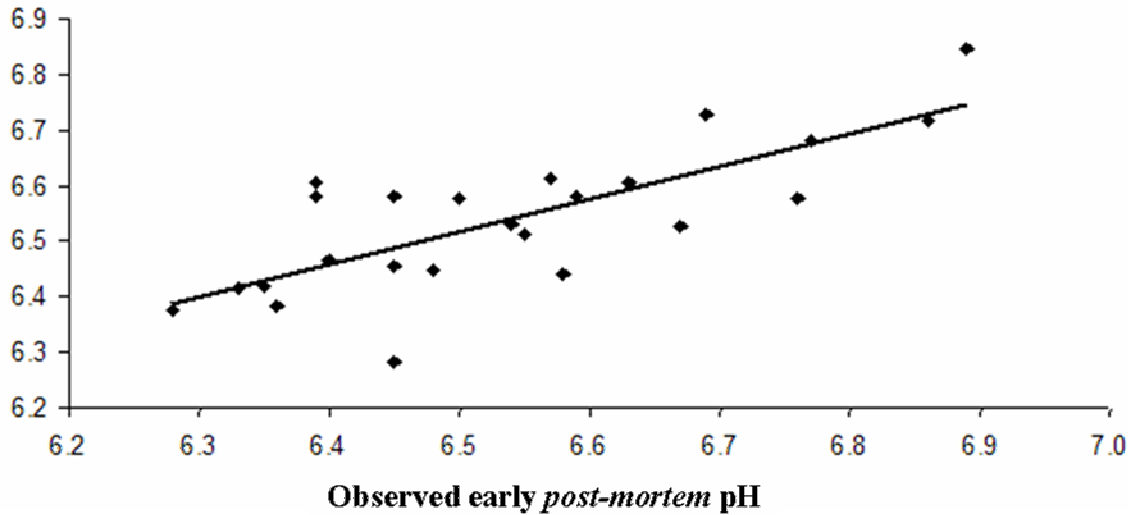
412 The correlations between *HSP72* expression, muscle lightness and yellowness may be
413 explained by variations in *post-mortem* pH decline. Generally, low early and ultimate *post-*
414 *mortem* pH increase lightness, due to increased denaturation of proteins and increased
415 distance between myofibrillar proteins, respectively (Offer et al., 1989; Lindahl et al., 2006).
416 It is also known that low early and ultimate *post-mortem* pH increases yellowness (Lindahl et
417 al., 2006; Brewer et al., 2001).

418 Proteomic studies on muscle samples obtained at slaughter have earlier demonstrated
419 relationships between heat shock proteins, muscle development and meat quality. In beef,
420 muscle hypertrophy was associated with lower *HSP20* (p20) levels and increased *HSP27*

421 Fig. 2. Plot of observed value of early *post-mortem* pH and predicted value obtained by
422 multiple regression model.

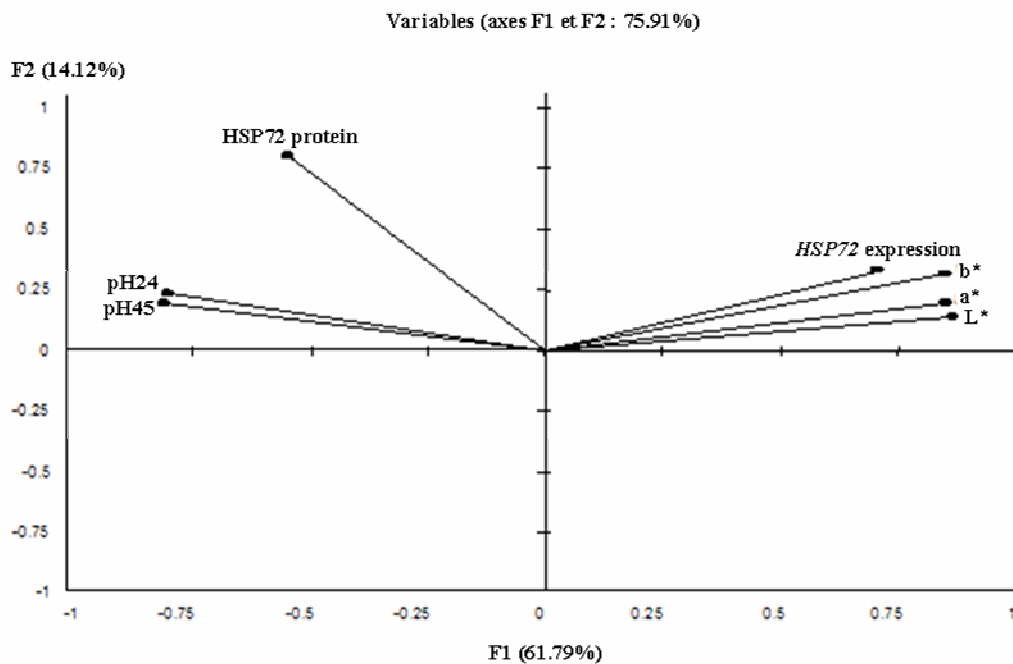
424 Figure 2

Predicted early *post-mortem* pH



425
426
427 Fig. 3. PCA plot of HSP72 content, *HSP72* expression, and meat quality traits correlated with
428 *HSP72* expression.

Figure 3



429 levels predicted increased tenderness (Morzel et al., 2008; Bouley et al., 2004). In pigs,
430 compensatory growth was associated with lower HSP27 levels (Lametsch et al., 2006). Dark
431 pork (low L*) was characterised by increased levels of HSP27 and α B-crystallin (Hwang et
432 al., 2004; Sayd et al., 2006). HSP20, HSP27 and α B-crystallin are known to be associate with
433 myofibrillar proteins (Golenhofen et al., 2004) and at least part of these effects may reflect
434 differences in extractability of the proteins (Kwasiborski et al., 2008 a). Relationships were
435 also found with larger heat shock proteins. HSP72 polymorphisms were found to be
436 associated with meat lightness in pigs and decreased DNAJA1 expression, coding for HSP40,
437 predicted increased tenderness in beef (Bernard et al., 2007; Schwerin et al., 1999).

438 Higher levels of GDI2 expression and lower levels of GDI2 predicted increased thawing.
439 The effect was explained by the relationship between *GDI2* expression and pH 24 h *post-*
440 *mortem*, and pH 24 h *post-mortem* and thawing loss: inclusion of pH 24 h *post-mortem*
441 removed GDI2 expression and GDI2 levels from the model for thawing loss explaining 55%
442 of variability. The correlation between *GDI2* expression and ultimate pH is difficult to
443 interpret in biological terms. *GDI2* expression was correlated ($r=-0.66$; $p<0.001$) with
444 myoglobin levels (spot 7005), suggesting that increased *GDI2* expression reflected increased
445 presence of glycolytic fibres, which may lead to lower ultimate pH (Laborde et al., 1985;
446 Monin et al., 1987).

447 Expression levels of *ANXA2*, but not protein levels, were correlated with GP and L*. Some
448 correlations were only significant in specific treatment groups. *HSP72* and *ANXA2* expression
449 levels were correlated with thawing loss in castrated males ($r=0.59$; $p<0.05$) and in Large
450 White-sired pigs ($r=0.59$; $p<0.05$), respectively. *ANXA2* is involved in many cellular
451 functions and the correlation between its expression levels and meat quality traits are difficult
452 to explain. The positive correlation between *HSP72* expression and thawing loss is coherent
453 with the above described associations between increased *HSP72* expression and lower
454 ultimate pH, and increased thawing loss at lower ultimate pH. *cMDH* expression levels were
455 correlated with ultimate pH in females ($r=0.76$; $p<0.01$) and with drip loss in Duroc-sired pigs
456 (day 3, $r=-0.60$; $p<0.05$). In mice, *cMDH* expression levels were found to be higher in red
457 compared to white muscle (Campbell et al., 2001). Female or Duroc pigs with higher *cMDH*
458 expression levels might thus have higher proportions of red muscle fibres, which have often
459 higher ultimate pH and less drip loss (Table 5; Huff-Lonergan and Lonergan, 2005; Locke et
460 al., 1991; 1994).

461 In summary, results show that effects of treatment factors on gene expression were less
462 pronounced than on protein levels published recently (Kwasiborski et al., 2008 a; b) and that
463 gene expression and levels of the corresponding protein were generally unrelated. In contrast,
464 expression levels of several genes were correlated. Finally, most meat quality traits were
465 correlated with expression of at least one of the studied genes. The most meaningful of these
466 correlations was the association of a slower and less pronounced pH decline, with lower levels
467 of *HSP72* expression and higher levels of HSP72. These relationships are possibly related to
468 fibre type composition and pre-slaughter stress levels.

469

470

471

472 **Abbreviations used**

473 HSP72, Heat Shock Protein 72kDa; mRNA, messenger Ribonucleic acid; PIC, Pig
474 International Company (present name: Genus); GP, Glycolytic Potential, bp, Base Pair;
475 cDNA, complementary desoxyribonucleic acid; qRT-PCR, quantitative Reverse Transcription
476 Polymerase Chain Reaction; Cp, Crossing Point; PCA, Principal Component Analysis; HPRT,
477 Hypoxanthine phosphoribosyltransferase; PPIA, Cyclophilin; 28S, 28S rRNA; CKM,
478 Muscular Creatine Kinase; AK1, Adenylate Kinase 1; ATP, Adenosine 5'-Triphosphate; ADP,
479 Adenosine 5'-Diphosphate; AMP, Adenosine 5'-Monophosphate; TPI, Triosephosphate
480 isomerase; GAPDH, Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase; cMDH, cytosolic Malate
481 Dehydrogenase; NADH,H⁺, reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide; NAD⁺, oxidised
482 Nicotinamide Adenine Dinucleotide; HSP70, Heat Shock Protein 70kDa; HSP73, Heat Shock
483 Protein 73kDa; ANXA2, Annexin A2; GDI2, Guanosine Diphosphate Dissociation Inhibitor
484 2; ACY1, Aminoacylase 1; MB, Myoglobin; MyHC, Myosin Heavy Chain; HSP27, Heat
485 Shock Protein 27kDa.

486

487

488 **Acknowledgement**

489 The present study was financed by INRA (France) and Genus Plc (UK).

490

491 **Litterature cited**

492

493 Anderson L., Seilhamer J. (1997) A comparison of selected mRNA and protein abundances in
494 human liver. *Electrophoresis*. **18**, 533-537.

495

496 Aukrust I., Hollas H., Strand E., Evensen L., Trave G., Flatmark T., Vedeler A. (2007) The
497 mRNA-binding Site of Annexin A2 Resides in Helices C-D of its Domain IV. *Jouranl of*
498 *Molecular Biology* **368** (5), 1367-1378.

499

500 Bai Q., McGillivray C., Da Costa N., Dornan S., Evans G., Stear M.J., Chang K.C. (2003)
501 Development of a porcine skeletal muscle cDNA microarray: analysis of differential transcript
502 expression in phenotypically distinct muscles. *BMC Genomics* **4**, 8-21.

503

504 Bendall J.R. (1973) *Post-mortem* changes in muscle. in Structure and Function of Muscle. 2nd
505 ed. G.H. Bourne, ed. Academic Press, New York, NY. Pages 244-309

506

507 Bergmeyer H.U. (1974) Methods of enzymatic analysis. *Verlag Chemie Weinheim* **2196** (3),
508 1196-1201.

509

510 Bernard C., Cassar-Malek I., Le Cunff M., Dubroeuq H., Renand G., Hocquette J-F. (2007)
511 New indicators of beef sensory quality revealed by expressn of specific genes. *Journal of*
512 *Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 5229-5237.

513

514 Bouley J., Chambon C., Picard B. (2004) Mapping of bovine skeletal muscle proteins using
515 two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* **4**,1811-1824.

516

517 Brewer M.S., Zhu L.G., Bidner B., Meisinger D.J., McKeith F.K. (2001) Measuring pork
518 color: effects of bloom time, muscle, pH and relationship to instrumental parameters. *Meat*
519 *Science* **57** (2), 169-176.

520

521 Campbell W.G., Gordon S.E., Carlson C.J., Pattison J.S., Hamilton M.T., and Booth F.W.
522 (2001) Differential global gene expression in red and white skeletal muscle. *American Journal*
523 *of Physiology, Cell Physiology.*, **280**, C763-C768.

524

525 Celis J.E., Kruhoffer M., Gromova I., Frederiksen C., Ostergaard M., Thykjaer T., Gromov P.,
526 Yu J., Palsdottir H., Magnusson N., Orntoft T.F. (2000) Gene expression profiling:
527 monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics:
528 Functional Genomics. *FEBS Letters* **480**, 2-16.

529

530 Chen G., Gharib T.G., Huang C.-C., Taylor J.M.G., Misek D.E., Kardia S.L.R., Giordano T.J.,
531 Iannettoni M.D., Orringer M.B., Hanash S.M., Beer D.G. (2002) Discordant Protein and
532 mRNA Expression in Lung Adenocarcinomas. *Molecular and Cellular Proteomics* **1**, 304-
533 313.

534

535 Chen Z.J., Vetter M., Chang G.D., Liu S., Che D., Ding Y., Kim S.S., Chang C.H. (2004)
536 Cyclophilin A functions as an endogenous inhibitor for membrane-bound guanylate cyclase-
537 A. *Hypertension* **44**, 963-968.

538

539 Collin P.L., Moore J.J., Lundgren D.W., Choobineh E., Chang S.M., Chang A.S. (2000)
540 Gestational changes in uterine L-type calcium channel function and expression in guinea pig.
541 *Biology of Reproduction* **63**, 1262-1270.

542

543 De Nobel H., Lawrie L., Brul S., Klis F., Davis M., Alloush H., Coote P. (2001) Parallel and
544 comparative analysis of the proteome and transcriptome of sorbic acid-stressed
545 *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **18**, 1413-1428.

546

547 Denz C.R., Dube D.K. (2005) The benefits of 28S rRNA for standardization of reverse
548 transcription-polymerase chain reaction for studying gene expression. *Analytical Biochemistry*
549 **341**, 382-384.

550

551 Dihal A.A., Van Der Woude H., Hendriksen P.J. M., Charif H., Dekker L.J., Jsselstijn L.I., De
552 Boer V.C. J., Alink G.M., Burgers P.C., Rietjens I.M.C.M., Woutersen R.A., Stierum R.H.
553 (2007) Transcriptome and proteome profiling of colon mucosa from quercetin fed F344 rats

554 point to tumor preventive mechanisms, increased mitochondrial fatty acid degradation and
555 decreased glycolysis. *Proteomics* **8**, 45-61.

556

557 Duthie C., Simm G., Doeschl-Wilson A., Kalm E., Knap P.W., Roche R. (2008) Quantitative
558 trait loci for chemical body composition traits in pigs and their positional associations with
559 body tissues, growth and feed intake. *Animal Genetics* **39**, 130-140.

560

561 Dzeja P.P., Terzic A. (2003) Phosphotransfer networks and cellular energetics. *The Journal of*
562 *Experimental Biology* **206** (12), 2039-2047.

563

564 El Rammouz R., Babilé R., Fernandez X. (2004) Effect of ultimate pH on the
565 physicochemical and biochemical characteristics of turkey breast muscle showing normal rate
566 of post-mortem pH fall. *Poultry Science* **83**, 1750-1757.

567

568 Everett A.W., Prior G., Clark W.A., Zak R. (1983) Quantitation of myosin in muscle.
569 *Analytical Biochemistry* **130** (1), 102-107.

570

571 Filipenko N.R., MacLeod T.J., Yoon C.-S., Waisman D.M. (2004) Annexin A2 Is a Novel
572 RNA-binding Protein. *Journal of Biological Chemistry* **279** (10), 8723-8731.

573

574 Filipenko N.R., Waisman D.M. (2003) Annexins: Biological importance and annexin-related
575 pathologies. Landes Bioscience, Georgetown, TX.

576

577 Golenhofen N., Perng M.D., Quinlan R.A., Drenckhahn D. (2004) Comparison of the small
578 heat shock proteins alphaB-crystallin, MKBP, Hsp25, Hsp20, and cvHSP in heart and skeletal
579 muscle. *Histochemistry and Cell Biology* **122**, 415-425.

580

581 González B., Hernando R., Manso R. (2000) Stress proteins of 70 kDa in chronically
582 exercised skeletal muscle. *European Journal of Physiology* **440**, 42-49.

583

584 Gunawan A.M., Park S.K., Pleitner J.M., Feliciano L., Grant A.L., Gerrard D.E. (2007)
585 Contractile protein content reflects myosin heavy-chain isoform gene expression. *Journal of*
586 *Animal Science* **85** (5), 1247-1256.

587
588 Gygi S.P., Rochon Y., Franza B.R., Aebersold R. (1999) Correlation between protein and
589 mRNA abundance in yeast. *Molecular and Cellular Biology* **19**, 1720-1730.
590
591 Hayes D.J., Taylor D.J., Bore P.J., Hilton-Jones D., Arnold D.L., Squier M.V., Gent A.E.,
592 Radda G.K. (1987) An unusual metabolic myopathy: a malate-aspartate shuttle defect.
593 *Journal of Neurological Science* **82**, 27-39.
594
595 Heil A., Muller G., Noda L., Pinder T., Schirmer H., Schirmer I., von Zabern I. (1974) The
596 amino-acid sequence of sarcosine adenylate kinase from skeletal muscle. *European Journal of*
597 *Biochemistry* **43**, 131-144.
598
599 Hendricks H.B., Lafferty D.T., Aberle E.D., Judge M.D., Forrest J.C. (1971) Relation of
600 Porcine Muscle Fiber Type and Size to Postmortem Shortening. *Journal of Animal Science* **32**
601 (1), 57-61.
602
603 Hernando R., Manso R. (1997) Muscle fibre stress in response to exercise: synthesis,
604 accumulation and isoform transitions of 70-kDa heat-shock proteins. *Eur. J. Biochem.* **243**,
605 460-467.
606
607 Hollas H., Aukrust I., Grimmer S., Strand E., Flatmark T., Vedeler A. (2006) Annexin A2
608 recognises a specific region in the 3'-UTR of its cognate messenger RNA: 9th European
609 Symposium on Calcium. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular and Cell Research* **1763**
610 (11), 1325-1334.
611
612 Honikel K.O. (1998) Reference methods for the assessment of physical characteristics of
613 meat. *Meat Science* **49**, 447-457.
614
615 Huff-Lonergan E., Lonergan S.M. (2005) Mechanisms of water-holding capacity of meat: the
616 role of post-mortem biochemical and structural changes. *Meat Science* **71**, 194-204.
617

618 Hwang I.H., Park B.Y., Cho S.H., Kim J.H., Choi Y.S., Lee J.M. (2004) Identification of
619 muscle proteins related to objective meat quality in Korean native black pig. *Asian*
620 *Australasian Journal of Animal Science* **17** (11), 1599-1607.

621

622 Izaguirre G., Kikonyogo A., Pietruszko R. (1997) Tissue Distribution of Human Aldehyde
623 Dehydrogenase E3 (ALDH9): Comparison of Enzyme Activity with E3 Protein and mRNA
624 Distribution. *Biochemistry and Molecular Biology* **118** (1), 59-64.

625

626 Janssen E., de Groof A., Wijers M., Fransen J., Dzeja P.P., Terzic A., Wieringa B. (2003)
627 Adenylate Kinase 1 Deficiency Induces Molecular and Structural Adaptations to Support
628 Muscle Energy Metabolism. *Journal of Biological Chemistry* **278** (15), 12937-12945.

629

630 Kwasiborski A., Sayd T., Chambon C., Santé-Lhoutellier V., Rocha D., and Terlouw C.
631 (2008) Pig *Longissimus lumborum* proteome: Part I: Effects of genetic background, rearing
632 environment and gender. *Meat Science* doi: 10.1016/j.meatsci.2008.04.028

633

634 Kwasiborski A., Sayd T., Chambon C., Santé-Lhoutellier V., Rocha D., Terlouw C. (2008)
635 Pig *Longissimus lumborum* proteome: Part II: Relationships between protein quantity and
636 meat quality. *Meat Science* doi: 10.1016/j.meatsci.2008.04.032.

637

638 Laborde D., Talmant A., Monin G. (1985) Activités enzymatiques métaboliques et
639 contractiles de 30 muscles du porc. Relations avec le pH ultime atteint après la mort.
640 *Reproduction Nutrition Development* **25**, 619-628.

641

642 Lametsch R., Kristensen L., Larsen M.R., Therkildsen M., Oksbjerg N., Ertbjerg P. (2006)
643 Changes in the muscle proteome after compensatory growth in pigs. *Journal of Animal*
644 *Science* **84**, 918-924.

645

646 Laville E., Sayd T., Terlouw C., Chambon C., Damon M., Larzul C., Leroy P., Glénisson J.,
647 Chérel P. (2007) Comparison of sarcoplasmic proteomes between two groups of pig muscles
648 selected for shear force of cooked meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55** (14),
649 5834-5841.

650

651 Lawrie R.A. (1953) The activity of the cytochrome system in muscle and its relation to
652 myoglobin. *Biochemistry Journal* **55**, 298-305.
653

654 Lindahl G., Henckel P., Karlsson A.H., Andersen H.J. (2006) Significance of early *post-*
655 *mortem* temperature and pH decline on colour characteristics of pork loin from different
656 crossbreeds. *Meat Science* **72**, 613-623.
657

658 Lobjois V., Liaubet L., SanCristobal M., Glénisson J., Fève K., Rallières J., Le Roy P., Milan
659 D., Cherel P., Hately F. (2008) A muscle transcriptome analysis identifies positional candidate
660 genes for a complex trait in pig. *Animal Genetics* **39**, 147-162.
661

662 Locke M., Atkinson B.G., Tanguay R.M., Noble E.G. (1994) Shifts in type I fiber proportion
663 in rat hindlimb muscle are accompanied by changes in HSP72 content. *American Journal of*
664 *Physiology* **266**, C1240-C1246.
665

666 Locke M., Noble E.G., Atkinson B.G. (1991) Inducible isoform of HSP70 is constitutively
667 expressed in a muscle fiber type specific pattern. *American Journal of Physiology* **261**, C774-
668 C779.
669

670 Manabe N., Azuma Y., Furuya Y., Kuramitsu K., Nagano N., Miyamoto H. (1995)
671 Immunohistochemical microquantification of fast-myosin in frozen histological sections of
672 mammalian skeletal muscles. *Journal of Animal Science* **73** (1), 88-95.
673

674 Meunier B., Bouley J., Picc I., Bernard C., Picard B., Hocquette J-F. (2005) Data analysis
675 methods for detection of differential protein expression in two-dimensional gel
676 electrophoresis. *Analytical Biochemistry* **340**, 226-230.
677

678 Monin G., Mejenes-Quijano A., Talmant A., Sellier P. (1987) Influence of breed and muscle
679 metabolic type on muscle glycolytic potential and meat pH in pigs. *Meat Science* **20**, 149-158.
680

681 Monin G., Sellier P. (1985) Pork of low technological quality with a normal rate of pH fall in
682 the immediate *post-mortem* period: the case of the Hampshire breed. *Meat Science* **13**, 49- 63.
683

684 Morzel M., Terlouw C., Chambon C., Micol D., Picard B. (2008) Muscle proteome and meat
685 eating qualities of Longissimus thoracis of "Blonde d'Aquitaine" young bulls: a central role of
686 HSP27 isoforms. *Meat Science* **78**, 297-304.

687

688 Mozdziak P.E., Dibner J.J., McCoy D.W. (2003) Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
689 expression varies with age and nutrition status. *Nutrition* **19** (5), 438-440.

690

691 Mullen A.M., Stapleton P.C., Corcoran D., Hamill R.M., White A. (2006) Understanding
692 meat quality through the application of genomic and proteomic approaches: 52nd International
693 Congress of Meat Science and Technology (52nd ICoMST) 13-18 August 2006 Dublin,
694 Ireland. *Meat Science* **74**, 3-16.

695

696 Offer G., Knight P., Jeacocke R., Almond R., Cousins T., Elsey J., Parsons N., Sharp A., Starr
697 R., Purslow P. (1989) The structural basis of the water-holding, appearance and toughness of
698 meat and meat products. *Food Microstructure* **8**, 151-170.

699

700 Peffer P.L., Lin X., Odle J. (2005) Hepatic B-oxidation and carnitine palmitoyltransferase I in
701 neonatal pigs after dietary treatments of clofibrac acid, isoproterenol, and medium-chain
702 triglycerides. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative*
703 *Physiology* **288**, 1518-1524.

704

705 Perrier J., Durand A., Giardina T., Puigserver A. (2005) Catabolism of intracellular N-
706 terminal acetylated proteins: involvement of acylpeptide hydrolase and acylase. *Biochimie* **87**
707 (8), 673-685.

708

709 Persson B., Flinta C., Heijne G., Jornvall H. (1985) Structures of N-terminally acetylated
710 proteins. *European Journal of Biochemistry* **152** (3), 523-527.

711

712 Pimenta A.S., Lambertucci R.H., Gorjao R., Silveira L.R., Curi R. (2007) Effect of a single
713 session of electrical stimulation on activity and expression of citrate synthase and antioxidant
714 enzymes in rat soleus muscle. *European Journal of Applied Physiology* **102**, 119-126.

715

716 Pylypenko O., Rak A., Durek T., Kushnir S., Dursina B.E., Thomae N.H., Constantinescu
717 A.T., Brunsveld L., Watzke A., Waldmann H., Goody R.S., Alexandro K. (2006) Structure
718 of doubly prenylated Ypt1: GDI complex and the mechanism of GDI-mediated Rab recycling.
719 *EMBO Journal* **25**, 13-23.

720

721 Renerre M. (1990) Reviews: Factors involved in the discoloration of beef meat. *The*
722 *International Journal of Food Science and Technology* **25**, 613-630.

723

724 Sass J., Mohr V., Olbrich H., Engelke U., Horvath J., Fliegau M., Loges N., Schweitzer-
725 Krantz S., Moebus R., Weiler P., Kispert A., Superti-Furga A., Wevers R., Omran H. (2006)
726 Mutations in ACY1, the Gene Encoding Aminoacylase 1, Cause a Novel Inborn Error of
727 Metabolism. *American Journal of Human Genetics*. **78** (3), 401-409.

728

729 Sayd T., Morzel M., Chambon C., Franck M., Figwer P., Larzul C., Le Roy P., Monin G.,
730 Chérel P., Laville E. (2006) Proteome analysis of the sarcoplasmic fraction of pig
731 Semimembranosus muscle: Implication on meat color development. *Journal of Agricultural*
732 *and Food Chemistry* **54**, 2732-2737.

733

734 Schwerin M., Hagendorf A., Furbass R., Teuscher F. (1999) The inducible stress protein 70.2
735 gene: a candidate gene for stress susceptibility in swine. *Archiv für Tierzucht* **42**, 61-66.

736

737 Scott M.A., Locke M., Buck L.T. (2003) Tissue-specific expression of inducible and
738 constitutive Hsp70 isoforms in the western painted turtle. *Journal of Experimental Biology*
739 **206**, 303-311.

740

741 Shirley T.L., Lewers J.C., Egami K., Majumdar A., Kelly M., Ceballos-Picot I., Seidman
742 M.M., Jinnah H.A. (2007) A human neuronal tissue culture model for Lesch-Nyhan disease.
743 *Journal of Neurochemistry* **101**, 841-53.

744

745 Sirover M.A. (1999) New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian
746 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemical Biophysical Acta* **1432**, 159-184.

747

748 Sorger P.K., Pelham H.R. (1987) Cloning and expression of a gene encoding hsc73, the major
749 hsp70-like protein in unstressed rat cells. *EMBO Journal* **6**, 993-998.
750

751 Sudre K., Cassar-Malek I., Listrat A., Ueda Y., Leroux C., Jurie C., Auffray C., Renand G.,
752 Martin P., Hocquette J.-F. (2005) Biochemical and transcriptomic analyses of two bovine
753 skeletal muscles in Charolais bulls divergently selected for muscle growth. *Meat Science* **70**,
754 267-277.
755

756 Terlouw E.M.C., Porcher J., Fernandez X. (2005) Repeated handling of pigs during rearing.
757 II. Effect of reactivity to humans on aggression during mixing and on meat quality. *Journal of*
758 *Animal Science* **83**, 1664-1672.
759

760 Vedeler A., Hollas H. (2000) Annexin II is associated with mRNAs which may constitute a
761 distinct subpopulation. *Biochemical Journal* **348** (3), 565-572.

DISCUSSION GENERALE

Les travaux de cette thèse portent sur l'étude protéomique et, dans une moindre mesure, l'expression de certains gènes du muscle *Longissimus lumborum* de porc, dans le but de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le déterminisme des qualités des viandes.

Les qualités technologiques et sensorielles des viandes sont influencées en grande partie par les caractéristiques biochimiques du muscle au moment de la mort (Monin et Ouali, 1991). En effet, les qualités des viandes sont le résultat de phénomènes biochimiques intracellulaires *post-mortem* dépendant de l'équipement enzymatique, mais également de la quantité et de la forme de la principale source d'énergie de la cellule. Ces paramètres sont eux-mêmes dépendant de l'environnement dans lequel évolue l'animal et de ses caractéristiques génétiques. Au sein d'une même espèce, les caractéristiques des muscles peuvent varier en fonction de multiples facteurs, comme le patrimoine génétique (Sayd et al., 1998 ; Sayre et al., 1963 ; Sellier et Monin, 1994 ; Plastow et al., 2005), l'âge de l'animal (Candek-Potokar et al., 1998), l'entraînement physique (Petersen et al., 1997 ; Fry et al., 1994) ou le mode d'élevage (Bee et al., 2004 ; Gentry et al., 2004 ; Lebret et al., 1999 ; 2002 ; 2004). Les approches traditionnelles, biochimiques ou histochimiques, d'étude des caractéristiques des muscles étaient basées sur un petit nombre de protéines et ne prenaient pas en compte la complexité et la variété des mécanismes biochimiques mis en jeu ou leurs interactions. Depuis une dizaine d'années, les outils d'analyse du protéome, telle l'électrophorèse bidimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse pour l'identification des protéines, permettent de caractériser plus finement les particularités musculaires en offrant la possibilité d'étudier le protéome musculaire dans son ensemble. Dans cette étude, il a été fait le choix de s'intéresser au sous-protéome des protéines musculaires solubles dont le rôle est essentiel dans le métabolisme énergétique et les voies de transduction du signal. Leur étude permettrait d'élucider les mécanismes de régulation du métabolisme et de mieux comprendre le déterminisme des qualités des viandes. Les techniques de fractionnement cellulaire permettent d'accéder à ces fractions moins représentées du protéome (Sayd et al., 2006).

Les techniques d'analyse du transcriptome autorisent une vision globale des niveaux d'expression des gènes permettant de mieux comprendre les mécanismes biochimiques musculaires. En 2003, Bai et al développaient des puces à ADN du muscle squelettique de porc. Celles-ci n'étant pas commercialisées au moment de la réalisation des analyses transcriptomiques, il a été fait le choix d'utiliser la technique de RT-PCR quantitative. Cette technique, plus sensible et spécifique que les puces à ADN, permet également une quantification plus précise.

Tableau 3 : Effets des facteurs de variation, mode d'élevage, origine génétique et sexe sur les paramètres de qualités des viandes.

a. En utilisant les données des 48 porcs du projet SUSPORKQUAL.

b. En utilisant les données des 24 porcs sélectionnés dans mon étude.

a		Mode d'élevage		Race du père		Sexe	
		Extérieur	Intérieur	père Duroc	père Large White	Male castré	Femelle
45min	pH	6.56 ± 0.13	6.53 ± 0.18	6.53 ± 0.16	6.56 ± 0.16	6.58 ± 0.16	6.51 ± 0.15
	Lactate	46.69 ± 15.30	44.70 ± 13.73	46.28 ± 13.88*	44.98 ± 15.34	43.18 ± 15.58	47.98 ± 13.18
	Glycogène	37.74 ± 11.80	44.02 ± 14.07	36.64 ± 10.82	46.01 ± 14.31	37.90 ± 11.11	43.59 ± 15.59
	Potentiel glycolytique	133.16 ± 26.8	137.10 ± 19.46	130.12 ± 20.07	141.20 ± 25.85**	127.81 ± 24.53	141.78 ± 20.40*
	Température	38.93 ± 0.60	38.61 ± 1.00	38.75 ± 0.92	38.76 ± 0.76	38.73 ± 0.53	38.78 ± 1.07
24h	pH	5.51 ± 0.20	5.52 ± 0.13	5.52 ± 0.14	5.51 ± 0.19	5.57 ± 0.20*	5.47 ± 0.11
	Lactate	74.55 ± 11.34	73.81 ± 7.64	74.32 ± 6.55	74.01 ± 12.45	69.88 ± 11.18	78.09 ± 5.74
	Glycogène	12.16 ± 4.24**	11.76 ± 4.68	10.50 ± 3.11	13.73 ± 5.17***	10.85 ± 3.82	12.97 ± 4.76*
Perte en eau	Perte à 3 jours	4.56 ± 2.09	4.63 ± 1.80*	4.12 ± 1.53	5.14 ± 2.22**	4.11 ± 1.96	5.05 ± 1.82
	Perte à 5 jours	2.10 ± 0.94	2.29 ± 0.81	2.03 ± 0.84	2.39 ± 0.89	2.06 ± 0.83	2.33 ± 0.91*
	Perte à la cuisson	18.96 ± 3.93	20.23 ± 3.77	18.62 ± 3.92	20.78 ± 3.54	18.65 ± 3.80	20.46 ± 3.79
	Perte à la décongélation	11.78 ± 2.72	13.24 ± 3.26*	11.69 ± 2.21	13.51 ± 3.66*	11.10 ± 2.75	13.80 ± 2.82***
Couleur	L*	52.89 ± 5.04	51.58 ± 3.30	51.72 ± 3.76	52.86 ± 4.82	52.23 ± 4.99	52.24 ± 3.58
	a*	8.36 ± 1.72**	7.91 ± 1.57	7.90 ± 1.58	8.43 ± 1.72*	8.24 ± 1.95	8.05 ± 1.34
	b*	4.78 ± 1.92*	3.68 ± 1.25	3.95 ± 1.56	4.57 ± 1.82	4.41 ± 1.92	4.07 ± 1.47

b		Mode d'élevage		Race du père		Sexe	
		Extérieur	Intérieur	père Duroc	père Large White	Male castré	Femelle
45min	pH	6.57 ± 0.16	6.51 ± 0.16	6.53 ± 0.18	6.55 ± 0.15	6.58 ± 0.18	6.49 ± 0.13
	Lactate	44.77 ± 17.54	47.86 ± 13.78	46.57 ± 16.13	46.06 ± 15.56	42.94 ± 16.62	49.69 ± 14.25
	Glycogène	38.13 ± 12.59	38.21 ± 11.79	34.95 ± 9.13	41.4 ± 13.91	35.98 ± 11.46	40.36 ± 12.52
	Potentiel glycolytique	131.69 ± 30.56	133.84 ± 19.77	130.37 ± 21.33	135.16 ± 29.34	123.3 ± 28.21	142.22 ± 18.77
	Température	39.26 ± 0.48	38.73 ± 0.96	38.96 ± 0.94	38.95 ± 0.72	38.8 ± 0.58	39.12 ± 1.02
24h	pH	5.56 ± 0.22	5.53 ± 0.16	5.56 ± 0.14	5.53 ± 0.24	5.63 ± 0.23 **	5.47 ± 0.09
	Lactate	72.38 ± 13.93	71.94 ± 8.07	72.38 ± 7.22	71.94 ± 14.39	66.71 ± 12.94	77.61 ± 5.71 *
	Glycogène	11.31 ± 4.03	10.52 ± 3.45	9.88 ± 2.89	11.96 ± 4.24 *	9.4 ± 3.48	12.44 ± 3.43 ***
Water loss	Perte à 3 jours	4.52 ± 2.35	4.17 ± 1.88	3.38 ± 1.13	5.21 ± 2.43 *	3.59 ± 1.84	5.15 ± 2.12
	Perte à 5 jours	2.17 ± 0.93	2.15 ± 0.74	2.04 ± 0.76	2.27 ± 0.89	1.99 ± 0.78	2.34 ± 0.87
	Perte à la cuisson	18.48 ± 4.43	19.85 ± 3.27	18.11 ± 3.73	20.23 ± 3.88	18.31 ± 4.32	20.03 ± 3.33
	Perte à la décongélation	12.18 ± 2.62	13.24 ± 3.51	11.68 ± 2.11	13.73 ± 3.63 *	11.3 ± 3.17	14.12 ± 2.38 ***
Colour	L*	53.01 ± 6.13	51.74 ± 3.94	52.07 ± 4.62	52.68 ± 5.69	51.48 ± 5.98	53.27 ± 4.06
	a*	8.10 ± 1.60	8.5 ± 1.81	8.35 ± 1.97	8.24 ± 1.42	7.96 ± 1.89	8.64 ± 1.46
	b*	4.84 ± 2.07	4.02 ± 1.49	4.37 ± 1.90	4.49 ± 1.80	4.1 ± 2.04	4.76 ± 1.58

Dans un premier temps, afin d'appréhender les mécanismes de déterminismes des qualités des viandes, mais également les différents facteurs pouvant influencer ces mécanismes, une base de données protéomiques a été constituée et exploitée en utilisant trois méthodes statistiques différentes mais complémentaires, l'analyse de variance, l'analyse par régression multiple et l'analyse par composante principale, dont les résultats ont fait l'objet de publications soumises dans des journaux spécialisés.

Dans un deuxième temps et sur la base des premiers résultats indiquant les protéines d'intérêt, un certain nombre de gènes ont été sélectionnés pour en étudier l'expression. Les influences des différents facteurs de variation, et les liens entre ces expressions, l'abondance des protéines et les qualités de viandes, ont été étudiées. Les résultats ont fait l'objet d'une publication.

1- Importance des facteurs de variations

Au début de cette étude, nous disposions de 48 échantillons de muscle *Longissimus* de porc, issus du projet Européen « Sustainability in the production of pork with improved nutritional and eating quality using strategic feeding in out-door production », SUSPORKQUAL QLK5-2000-00162 (Coordinateur A. Karlsson). Grâce à ce projet, un certain nombre de caractéristiques du muscle *Longissimus post-mortem* était connues (Tableau 3a). La moitié des échantillons a été sélectionnée pour l'étude protéomique en tenant compte du potentiel glycolytique (Monin et Sellier, 1985) et du pH ultime et était équilibrée pour les facteurs de variation. Trois facteurs de variation ont été étudiés durant ma thèse, organisés dans un plan expérimental factoriel de 2 x 2 x 2. Le choix de ces facteurs de variation est basé sur les pratiques courantes et sur des considérations scientifiques. La grande majorité des porcs sont élevés en bâtiment. L'élevage extérieur se développe lentement mais présente certains intérêts (faibles coûts d'investissement, plus-value des viandes). Son intérêt scientifique est lié aux effets attendus de l'exercice et de la réduction du stress en élevage sur l'expression des protéines et les qualités des viandes. Ainsi, mon étude a comparé un élevage conventionnel, en intérieur sur caillebotis dans un enclos chauffé et ventilé contenant 6 animaux sur une surface de 6 m², avec un élevage alternatif, en extérieur sur une parcelle de 850 m². Chaque parcelle possédait une hutte de 7,5 m², une auge et un bassin rempli d'eau pour les possibles baignades. L'origine génétique comparait des animaux issus de mères

Tableau 4 : Mécanismes biochimiques expliquant les relations entre les protéines retenues par les modèles explicatifs des qualités de viandes et les paramètres de qualités de viandes.

Meat quality	Subgroup	protein retained in the model	Biochemical characteristic indicated by the protein	biochemical mechanism explaining the relationship (whether positive or negative) with the meat quality trait
Ultimate pH	Castrated males	cytosolic Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	increased NADH,H ⁺ oxidising capacity	total <i>post-mortem</i> energy metabolism
	Female	Muscular creatine kinase Dimeric dihydrodiol dehydrogenase	increased phosphor transfer increased presence of fast glycolytic fibre types	early <i>post-mortem</i> metabolism total <i>post-mortem</i> energy metabolism
a*	Castrated males	Muscular creatine kinase	increased phosphor transfer	early <i>post-mortem</i> metabolism -> oxidation
	Female	Calcium binding protein Raf kinase inhibitor protein	increased anti-oxidative capacity and presence of O ₂ increased presence of oxygen consuming enzymes	Oxidation Oxidation
Cooking loss	Castrated males	Antiquitin Unidentified protein	increased early <i>post-mortem</i> metabolism increased presence of fast glycolytic fibre types	early <i>post-mortem</i> energy metabolism total <i>post-mortem</i> energy metabolism
	Female	Isoform 2 of myosin light chain a-b-crystallin	decreased early <i>post-mortem</i> metabolism decreased early <i>post-mortem</i> metabolism	early <i>post-mortem</i> energy metabolism early <i>post-mortem</i> energy metabolism
Thawing loss	Castrated males	Actin interacting protein 1	increased depolymerisation of actin	denatured myofibrils
	Female	Unidentified protein	increased lipid-oriented metabolism	increased lipid content
Drip loss at day 3	Duroc sired	cytosolic Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	increased availability of energy substrate	total <i>post-mortem</i> energy metabolism
	Large White sired	Unidentified protein	decreased presence of metabolic enzymes decreased presence of fast glycolytic fibre types, decreased NADH,H ⁺ oxidising capacity	early <i>post-mortem</i> energy metabolism total <i>post-mortem</i> energy metabolism
L*	Large White sired	Muscular pyruvate kinase (inactive form)	decreased early <i>post-mortem</i> metabolism	early <i>post-mortem</i> energy metabolism
	Outdoor indoor	Myoglobin Heat shock protein 72kDa Unidentified protein Aminoacylase 1	decreased presence of fast glycolytic fibre types stress-induced increase in early <i>post-mortem</i> metabolism decreased presence of fast glycolytic fibres increased early <i>post-mortem</i> metabolism	total <i>post-mortem</i> energy metabolism early <i>post-mortem</i> energy metabolism total <i>post-mortem</i> energy metabolism early <i>post-mortem</i> energy metabolism

toutes identiques Large White x Landrace et de pères de race Large White ou Duroc. La race Large White est largement utilisée en élevage porcin pour sa prolificité, sa croissance et la qualité de sa viande. La race Duroc a acquis sa popularité en croisement terminal grâce à sa grande capacité d'adaptation, tout en ayant une croissance acceptable et un taux de gras intramusculaire supérieur. Enfin, l'étude comparait des mâles castrés ou des femelles. Les mâles entiers sont le plus souvent écartés de la filière car ils fournissent une viande dégageant une odeur désagréable. La sélection des échantillons a permis de conserver dans sa globalité l'influence des facteurs de variation sur les paramètres de qualité des viandes (Tableau 3b).

Les analyses conduites durant cette thèse ont permis de mettre en évidence l'importance de ces facteurs de variation sur les processus biochimiques *post-mortem* donc sur les paramètres qualitatifs des viandes.

1.1- Un effet majeur : le sexe

Le sexe est un facteur d'influence majeur sur les quantités de protéines et sur les qualités des viandes. Quarante-huit protéines sur les 220 spots matchés sur les gels présentent des quantités significativement différentes entre les deux sexes. En interaction avec le mode d'élevage, celui-ci influence 7 autres protéines et 9 en interaction avec la race du père. Ceci représente 47.3 % ce qui est une proportion plus grande ($p < 0.0001$) que celle attendue par chance (5%). Cette influence met en évidence l'importance des hormones sexuelles circulantes sur le métabolisme énergétique des cellules musculaires. Les profils protéiques, obtenus par électrophorèse 2D, suggèrent que chez les femelles, le métabolisme énergétique est orienté vers l'utilisation du glycogène alors que chez les mâles castrés il semble plus orienté vers l'utilisation des lipides. L'analyse de variance, appliquées aux données protéomiques, a démontré que les enzymes de la glycolyse et du cycle de Krebs sont surexprimées chez les femelles comparées aux mâles castrés laissant supposer que, pour la synthèse d'énergie, la voie métabolique glucidique est plus souvent utilisée que chez les mâles castrés. Ces résultats sont en accord avec ceux de Lafontan et Berlan (1995) qui ont observé une brusque augmentation de la lipolyse après la castration de rats mâles. Cette augmentation était par la suite neutralisée par l'injection de testostérone aux doses physiologiques. Une précédente étude chez le porc avait également montré que l'activité inhibitrice du récepteur adrénérgique α -2 sur la lipolyse n'était pas observable chez les animaux castrés (Coutinho et al., 1993). La surexpression du cytochrome Bc1, une protéine

Glycolyse

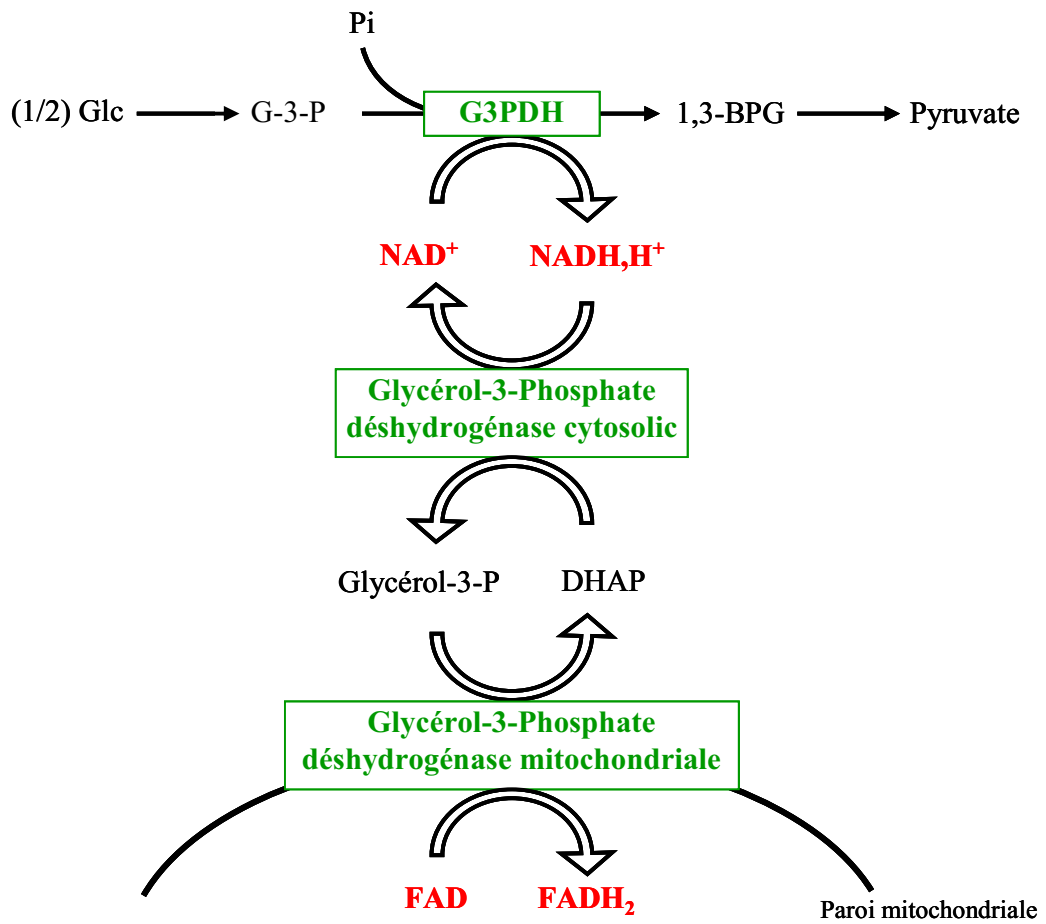


Figure 21: La navette Glycérol phosphate

constitutive de la chaîne respiratoire des mitochondries, chez les mâles castrés par rapport aux femelles est cohérente avec l'orientation métabolique des mâles castrés vers l'utilisation des lipides. En effet, la dégradation des lipides entraîne la formation d'acétyl-CoA et d'électrons, tous les deux entrant dans la chaîne respiratoire par l'intermédiaire du cytochrome Bc1 alors que la dégradation du glucose ne fournit qu'une forme de substrat, l'acétyl-CoA.

Outre leur rôle dans le métabolisme énergétique, les résultats laissent penser que les hormones sexuelles jouent également un rôle dans la formation du complexe actomyosine, au moins dans le muscle *post-mortem*. En effet, chez les mâles castrés, les protéines myofibrillaires sont surreprésentées par rapport aux femelles. La différence est très marquée et par conséquent, l'actine et la myosine permettent la classification correcte des 24 animaux selon leur sexe. La corrélation avec les valeurs de Bradford, qui reflètent la quantité de protéines extraites, indique que cette surabondance des protéines myofibrillaires traduit une plus forte extractabilité de ces protéines, probablement liée à une moindre formation du complexe actomyosine. D'autres études (Rubio-Gayasso et al., 2000 ; Estrada et al., 2006) montrent que chez les mâles entiers ou les femelles, les hormones sexuelles, testostérone et œstrogènes, activent les récepteurs à la ryanodine responsables de la libération de Ca^{2+} dans la cellule. Celui-ci initie la contraction musculaire en modifiant la conformation de la troponine, permettant la fixation des têtes de myosine sur les filaments d'actine. il est donc possible que dans le muscle *post-mortem* des mâles castrés, l'absence de testostérone est associée à des taux plus bas de Ca^{2+} entraînant une moindre formation du complexe actomyosine.

Le sexe des animaux influence également les 4 modèles de régressions multiples expliquant les pH ultime, couleur rouge (a^*), perte en eau à la cuisson et à la décongélation, par les abondances de certaines protéines. Dans chacun de ces modèles, les protéines retenues reflètent des variations dans les voies biochimiques impliquées dans le déterminisme de ces qualités des viandes entre les mâles castrés et les femelles (tableau 4). Chez les mâles castrés, le modèle pour expliquer les variations du pH ultime a retenu la forme cytosolique de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase. Son rôle s'explique par une augmentation de la capacité oxydative du $NADH, H^+$ dans la cellule. La glycérol-3-phosphate déshydrogénase cytosolique est un constituant de la navette glycérol phosphate (Fig. 21 ; Haddock and Jones, 1977; Holloszy et Booth, 1976) qui permet une oxydation plus rapide du $NADH, H^+$ que la voie de la phosphorylation oxydative. Sans renouvellement du pool de NAD^+ , la voie de la glycolyse ne pourrait plus fonctionner, la cellule ne serait plus fournie en énergie. Chez les femelles, le modèle pour expliquer les variations du pH ultime a retenu la dihydrodiol déshydrogénase, une enzyme de

détoxification des aldéhydes et des cétones, qui reflète une augmentation de la proportion des fibres rapides et glycolytiques. Plus succinctement, le modèle explicatif du a^* chez les mâles castrés est basé sur le métabolisme cellulaire à l'abattage alors que chez les femelles, le modèle représente la relation entre la capacité anti-oxydante de la cellule ainsi que la présence de protéines consommatrices d'oxygène et la couleur rouge. Le modèle explicatif de la perte en eau à la cuisson reflète, chez les mâles castrés et les femelles, des variations dans le métabolisme cellulaire à l'abattage. Chez les mâles castrés uniquement, la proportion de fibres rapides et glycolytiques influence également la perte en eau à la cuisson. Chez les mâles castrés, le modèle de la perte en eau à la décongélation s'explique par le niveau de la polymérisation de l'actine alors que chez les femelles, par la quantité des lipides intramusculaires. Cependant, à l'exception des modèles de la perte en eau à la décongélation, les modèles pour le pH ultime, le a^* et la perte en eau à la cuisson sont basées sur les mêmes voies biochimiques, quel que soit le sexe (Tableau 4). Ainsi, les variations dans le pH ultime s'expliquent par des variations dans le métabolisme énergétique *post-mortem*, les variations du a^* s'expliquent par la capacité oxydative des cellules et les variations de la perte en eau à la cuisson s'expliquent par la vitesse du métabolisme énergétique cellulaire et par la teneur en glycogène dans la cellule avant l'abattage.

Il est intéressant d'observer que les protéines permettant la classification des porcs selon les sexes appartiennent aux protéines myofibrillaires, ou sont liées à l'utilisation de substrats énergétiques différents par le métabolisme musculaire. L'analyse en composante principale a démontré qu'une isoforme d'actine et de chaîne légère de myosine permettaient chacune la classification correcte de 24 animaux selon leur sexe. De même, la tropomyosine 2β classe correctement 23 porcs selon leur sexe. Ces résultats sont à relier avec ceux obtenus lors de l'analyse de variance, qui observaient une différence de solubilité des protéines myofibrillaires entre les mâles castrés et les femelles, démontrant probablement l'influence des hormones sexuelles circulantes sur la concentration en calcium intracellulaire donc sur la formation du complexe actomyosine (Rubio-Gayasso et al., 2000 ; Estrada et al., 2006). Le cytochrome Bc1, n'appartient pas aux protéines myofibrillaires, toutefois, il permet la classification correcte des 24 porcs selon leur sexe. Comme indiqué ci-dessus, la surreprésentation de cette protéine chez les mâles castrés pourrait traduire une utilisation plus élevée des lipides comme source d'énergie que chez les femelles chez qui la dégradation du glycogène serait plus favorisée.

1.2- Des effets plus limités : le mode d'élevage et l'origine génétique

En comparaison avec le sexe, le mode d'élevage et l'origine génétique possèdent un moindre effet sur les quantités de protéines, les qualités de viandes ainsi que sur les modèles explicatifs des qualités des viandes. En effet, le mode d'élevage et l'origine génétique influencent respectivement 22 et 10 protéines sur les 220 matchés, aucune et trois qualités de viande sur les 15 étudiées, et un et 2 modèles sur les 9 étudiés.

Le mode d'élevage

Vingt-deux protéines sont influencées directement par le mode d'élevage. En interaction avec la race du père, celui-ci influence 4 autres protéines et 8 en interaction avec le sexe. Ceci représente 15.5 % ce qui est une proportion plus grande ($p < 0.001$) que celle attendue par chance (5%). Concernant les effets directs, chez les animaux élevés en extérieur, on observe une surexpression de différentes protéines spécifiques des fibres oxydatives, 2 isoformes de myoglobine, une protéine de transport d'oxygène. L'Heat Shock Protein 72kDa (HSP72), la forme de la famille des HSP70 dont les taux augmentent lors du stress (Oishi et al., 2002 ; Gonzàlez et al., 2000 ; Craig et al., 1983; Sorger et Pelham, 1987; Johnson et Fleshner, 2006), mais qui présente également des taux plus élevés dans les fibres oxydatives (Locke et al., 1994), sont également surreprésentée chez ces mêmes animaux. A l'opposé, les trois protéines glycolytiques, influencées par le mode d'élevage, sont surexprimées chez les intérieurs. Ces résultats suggèrent que l'élevage extérieur favorise les fibres de types oxydatives, plus résistantes à l'exercice physique, que les fibres glycolytiques. Ces résultats sont en accord avec de nombreuses études qui ont démontré la plus forte proportion de fibres rouges dans les muscles de porcs élevés à l'extérieur (Gentry et al., 2004; Lebret et al., 2002 ; Andrés et al., 2001).

Seul le modèle explicatif de la variabilité de la luminosité (L^*) est influencé par le mode d'élevage. Chez les porcs extérieurs, une isoforme de myoglobine et l'HSP72 sont les deux protéines retenues pour expliquer 84% de la variabilité du L^* . Un taux de myoglobine plus élevé reflète sans doute une proportion plus importante de fibres oxydatives. Les fibres oxydatives contiennent moins de glycogène, donnant souvent lieu à un pH ultime plus élevé (Laborde et al., 1985 ; Monin et al., 1987) et une viande plus sombre (Rennerre, 1990). Les muscles contenant plus d'HSP72 donnaient également lieu à des viandes plus sombres. Le

lien entre des taux d'HSP72 augmentés et des viandes plus sombres réside probablement dans le fait qu'ils reflètent des niveaux de stress subis plus élevés. Le stress précédant l'abattage favorise l'utilisation des réserves musculaire en glycogène, résultant en des pH plus élevés et des viandes plus sombres (Fernandez et al., 1994 ; Terlouw et al., 2008 ; Renerre, 1990).

Le modèle explicatif du L* chez les porcs intérieurs retient une protéine non identifiée reflétant probablement une différence dans les proportions de types de fibres, et l'aminocylase 1, reflétant le taux du métabolisme *post-mortem* peu après la mort. Les taux de ces 2 protéines expliquent 58% de la variabilité du L*. On remarque donc, que les voies biochimiques représentées par les protéines retenues dans les modèles explicatifs du L*, la vitesse métabolique juste après la mort et la production totale de protons et de lactate, sont similaires pour les deux modes d'élevage. On observe également des différences. Par exemple, les proportions des types de fibres semblent plutôt influencer la vitesse de la diminution du pH chez les extérieurs, et la production totale de protons et de lactate chez les intérieurs (Tableau 4). Le muscle LD des porcs élevés en extérieur présentent une proportion plus importante de fibres rouges pour lesquelles la vitesse de diminution du pH *post-mortem* est plus lente (Klont et al., 1998). A la différence, les porcs élevés en intérieur présentent une proportion plus importante de fibres glycolytiques qui possèdent une proportion plus importante de glycogène *ante-mortem* impliquant une production plus importante de protons et de lactate.

Les résultats ont montré que sur les animaux utilisés, l'effet du mode d'élevage sur les niveaux de protéines dépend du sexe des animaux. L'analyse en composantes principales n'a pas permis l'identification d'une ou deux protéines permettant la classification correcte des animaux selon l'élevage. Toutefois, si le sexe est pris en compte comme caractéristique des animaux, 22 animaux sont correctement classés selon leur mode d'élevage et leur sexe en utilisant 2 protéines, la peroxiredoxin 6 et une protéine non identifiée. La peroxiredoxin 6 est influencée par l'interaction entre le mode d'élevage et le sexe, permettant de différencier les femelles élevées en extérieur des mâles castrés élevés en intérieur. L'analyse des protéines corrélées à la peroxiredoxin 6, suggère que celle-ci reflète la proportion de fibres glycolytiques dans le muscle. La protéine non identifiée permet de différencier les mâles castrés des femelles. L'analyse des protéines corrélées à cette protéine suggère qu'elle reflète l'orientation métabolique des animaux en différenciant ceux orientés vers un métabolisme utilisant les lipides et ceux utilisant la voie de dégradation du glycogène. Cette analyse suggère, de manière inattendue que les taux d'une protéine anti-oxydante, la peroxiredoxin 6 (Wang et al., 2005), étaient plus élevés dans les types de fibres glycolytiques qu'oxydatives.

De nombreuses études ont démontré que les activités des protéines anti-oxydantes étaient supérieures dans les fibres oxydatives que dans les fibres glycolytiques (Kaczor et al., 2007 ; Lawler et al., 1993). Toutefois, ces études ont été réalisées sur la glutathion peroxidase, la superoxide dismutase et la catalase. Les taux de peroxiredoxin 6 dans les différents types de fibres restent à déterminer.

L'origine génétique

La race du père est un paramètre ne présentant qu'une influence limitée, à la fois sur les qualités des viandes, les quantités de protéines et les modèles explicatifs des qualités de viandes. Dix protéines sur les 220 matchées ont des quantités différentes selon l'origine génétique de l'animal. Trois et 16 autres protéines sont influencées par la race du père, en interaction avec le mode d'élevage (voir ci-dessus) et le sexe, respectivement. L'ensemble représente une proportion de 13.2 % ce qui est significativement plus élevé ($p < 0.001$) que la proportion attendue par chance (5%). Certaines des protéines qui reçoivent un effet direct de la race du père semblent montrer une différence dans le métabolisme énergétique entre les deux races. Une isoforme de pyruvate kinase est surreprésentée chez les animaux de père Duroc et une isoforme d'enolase 3 est surexprimée chez les animaux de père Large White, laissant supposer que chez les premiers, il existe une entrée supplémentaire de phosphoénolpyruvate, substrat de la pyruvate kinase, provenant probablement du métabolisme des acides aminés comme le tryptophane, la phénylalanine ou la tyrosine. (Chatterton et al., 1984).

Trois des caractéristiques des muscles *post-mortem*, la teneur en glycogène à 24h après l'abattage et les pertes en eau à 3 jours *post-mortem* et à la décongélation, reçoivent un effet direct de l'origine génétique.

Le modèle explicatif de la perte en eau à 3 jours *post-mortem* et celui de la perte en eau à la décongélation sont différents selon la race du père. Les modèles montrent que pour les porcs de père Duroc, la quantité d'exsudat et les pertes à la décongélation dépendent plutôt du métabolisme global *post-mortem*, alors que pour les porcs de père Large White, la vitesse du métabolisme juste après la mort a un impact plus important (tableau 4).

Les résultats obtenus par l'analyse en composantes principales permettent d'observer l'influence de l'origine génétique sur le métabolisme de base des animaux. En effet, les niveaux de Heat Shock Protein 73kDa, la forme constitutive de la famille des HSP70 (Oishi et al., 2002 ; Scott et al., 2003 ; Hernando et Manson, 1997), permettent de classer correctement 21 animaux selon leur origine génétique. Les animaux de père Duroc possèdent un niveau de

HSP73 supérieur, et possiblement une activité chaperone de base plus importante, à ceux de père Large White. L'effet de l'origine génétique sur le niveau d'HSP73 peut également être dû à une différence hormonale entre les deux races du père (Foury et al., 2007; Terlouw et Rybarczyk, 2008). En effet, une telle différence a déjà été rapportée entre les mâles castrés et les femelles. Les rats femelles possédaient un niveau de base d'HSP73 inférieur dans les muscles *soleus* et *extensor digitorum longus* par rapport aux mâles (González et al., 2000; Nickerson et al., 2006). Une partie de cette différence était attribuée à l'effet des oestrogènes (Paroo et al., 1999; Paroo et al., 2002).

Dans la présente étude, les porcs étaient issus de 10 mères et seuls les pères étaient de races différentes. Avec d'autres dispositifs expérimentaux, utilisant des races pures, les effets génétiques auraient probablement été plus prononcés. De plus, les pères étaient issus d'une sélection génétique effectuée par Genus/PIC, avec l'introduction d'autres races (Hovenier, communication personnelle), ce qui a pu niveler les différences raciales.

Mes résultats protéomiques ont montré les effets du sexe, du mode d'élevage et de la génétique sur les niveaux des protéines dans la fraction soluble de la cellule. Les voies biochimiques impliquées dans le déterminisme des qualités des viandes sont globalement connues depuis des années (Bendall, 1973 ; Lawrie, 1960, Fernandez et al., 1992). Mes résultats enrichissent ces connaissances existantes. Ils montrent que, selon le groupe de traitement considéré, certaines voies peuvent avoir plus d'impact que d'autres (par exemple, métabolisme juste après l'abattage versus métabolisme *post-mortem* global) ou que des aspects différents de ces voies peuvent avoir un impact plus important (par exemple, le métabolisme juste après l'abattage peut-être plus élevé à cause de la capacité de transfert de phosphore de la cellule, ou à cause de la capacité d'oxydation du NADH,H⁺). Ils ont également permis de proposer des pistes dans l'identification de marqueurs protéiques des caractéristiques des porcs.

2- l'expression des gènes

Les caractéristiques phénotypiques, auxquelles appartiennent les paramètres de qualités des viandes, sont les conséquences de l'expression de l'information génétique contenue dans l'ADN. Cependant, les différentes étapes intermédiaires, transcription et traduction, sont régulées en fonction des besoins de l'organisme. L'analyse protéomique a permis de démontrer que l'influence des facteurs de variation sur les qualités des viandes était la conséquence de variations dans les mécanismes biochimiques du métabolisme cellulaire. Afin

d'étudier si l'influence des facteurs de variation était également la conséquence de modifications dans l'expression de certains gènes d'intérêt, une étude transcriptomique a été réalisée.

La méthode de RT-PCR quantitative permet d'étudier l'expression de certains gènes. Ainsi, le choix a été fait d'étudier l'expression des gènes correspondant à des protéines d'intérêt, c'est-à-dire des protéines corrélées aux paramètres de qualités des viandes. Dans l'étude protéomique, 111 protéines sur les 220 matchés sont influencées par au moins un des trois facteurs de variation et 97 protéines sont corrélées à au moins un paramètre de qualités des viandes. Sur les 22 gènes correspondant dont la séquence est connue, il a été possible de « designer » correctement 10 couples d'amorces. Les 10 gènes étudiés sont, l'*Aminoacylase 1 (ACY)*, l'*Adénylate kinase 1 (AK1)*, l'*Annexine A2 (ANXA2)*, la *Créatine kinase musculaire (CKM)*, la *Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH)*, la *Guanosine diphosphate dissociation inhibitor (GDI)*, l'*Heat shock protein de 72kDa (HSP72)*, la *Myoglobine (MB)*, la *Malate déshydrogénase (MDH)* et la *triosephosphate déshydrogénase (TPI)*. A l'exception de deux, les protéines correspondantes étaient influencées par au moins un des facteurs de variation.

Les résultats indiquent que les facteurs de variation agissent probablement sur les modifications post-traductionnelles pour influencer les quantités de protéines et non sur le niveau d'expression des gènes. En effet, l'analyse protéomique a démontré que 111 protéines sur les 220 spots matchés sont influencées par les trois facteurs de variation étudiés durant ma thèse représentant 50.5% alors que la quantification de l'expression des gènes a démontré que seuls 2 des 10 gènes étudiés, *MB* et *TPI*, étaient influencés par l'un des 3 facteurs de variation, et ce de manière peu prononcée.

Les résultats obtenus lors de l'analyse transcriptomique indiquent qu'il existe une relation limitée entre l'expression des gènes et les quantités de protéines. Seule l'expression du *GAPDH* est corrélée au taux de la protéine *GAPDH* correspondante. Cette faible correspondance est en accord avec d'autres études (De Nobel et al., 2001). Chen et al. (2002) démontrait, dans une analyse comparative du transcriptome et du protéome de l'adénocarcinome du poumon, que seulement 17% des protéines étaient corrélées aux taux d'ARNm des gènes correspondants. Toutefois, Gygi et al. (1999) et Gunawan et al. (2007) ont démontré que les corrélations sont plus fortes pour des protéines ayant des taux intracellulaires plus élevés. Contrairement à celles-ci, dans mon étude, la corrélation entre l'expression du gène de la *GAPDH* et de sa protéine est négative. Cette différence est probablement imputable aux réponses des animaux de mon étude aux procédures d'abattage.

Le chargement, le transport et le déchargement des porcs pendant les premières phases de l'abattage ont entraîné une augmentation de l'activité physique des animaux donc une augmentation de l'activité cellulaire, et probablement de l'expression des gènes correspondants. Dans le protocole utilisé, la sollicitation était moindre lors des dernières phases de l'abattage, par rapport aux premières. Durant les dernières phases de l'abattage, les niveaux de protéines étant suffisants pour maintenir le niveau d'activité cellulaire, moindre par rapport aux premières phases de l'abattage. La corrélation négative entre l'expression du *GAPDH* et les quantités de sa protéine est probablement expliquée par une inhibition du taux protéique sur l'expression des gènes.

Alors que les facteurs de variation influençaient relativement peu l'expression des gènes, l'expression de plusieurs gènes était corrélée avec des qualités des viandes. La corrélation la plus intéressante était celle entre le pH à 45 min et 24 h *post-mortem*, et l'expression du *HSP72*. De plus, le modèle peut être amélioré en y incluant les taux de la protéine HSP72, permettant ainsi d'expliquer respectivement 55 % et 41 % de la variabilité du pH 45 minutes *post-mortem* et du pH ultime. En comparaison, une protéine non identifiée explique 24 % de la variabilité du pH à 45 minutes post-mortem, une protéine (cG3PDH) chez les mâles castrés et deux protéines (CKM et DDD) expliquent respectivement 67 % et 83 % de la variabilité du pH ultime. Globalement, à l'exception du modèle du pH45, il semble que les variations dans les quantités de protéines permettent une moindre prédiction de la variabilité des qualités des viandes.

Mon analyse transcriptomique a montré l'effet limité du sexe, des conditions d'élevage et de la race sur les niveaux d'expression de différents gènes ainsi que sur leur relation avec les qualités des viandes. Mes résultats apportent, cependant, des connaissances supplémentaires sur la relation entre l'expression des gènes et les qualités des viandes. Ils ont démontré que le déterminisme des qualités des viandes n'était probablement pas une conséquence des modifications dans le niveau d'expression des gènes, mais plutôt dans la régulation des processus traductionnels.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, associer l'étude du transcriptome à celle du protéome permet une meilleure compréhension de la régulation de l'expression des gènes et des quantités des protéines impliquées dans les voies biochimiques du déterminisme des qualités des viandes. Mes résultats montrent la complexité des interactions entre l'expression des gènes, les quantités de protéines et les caractéristiques phénotypiques ainsi qu'au sein du protéome lui-même. Ces informations peuvent contribuer à une meilleure compréhension des causes de variabilité dans les qualités des viandes de porc.

Perspectives

Mes résultats montrent des liens entre des caractéristiques de porcs, leurs viandes et des protéines dans un contexte bien précis. D'autres études pourraient évaluer ces liens chez des porcs d'autres races, ou d'autres lignées, avec des caractéristiques phénotypiques ou génétiques précises, afin d'élargir nos connaissances.

Cette étude a montré que les niveaux de certaines protéines sont spécifiques pour certains types de porcs, en fonction de leur sexe, leur mode d'élevage ou leur origine génétique et également les différences prononcées entre les sexes utilisés, femelles ou mâles castrés. Pour comprendre les causes et les conséquences biochimiques des différences de niveau des protéines et le rôle des hormones sexuelles dans le métabolisme intracellulaire, d'autres études sont nécessaires. Par exemple, à l'aide de cultures de cellules obtenues de différents types de tissus (muscle par exemple) ou de porcs, il serait intéressant de déterminer l'effet de l'inhibition et de la stimulation de la production de la protéine spécifique sur les caractéristiques fonctionnelles de la cellule mais également l'influence des hormones sexuelles sur les voies métaboliques, les flux calciques entre le réticulum endoplasmique et le cytoplasme, l'activité du récepteur à la ryanodine et l'ATPase pompe à calcium et/ou les ponts myofibrillaires par différentes techniques (protéomique, dosages par immunofluorescence, microscopie). Ces études permettraient de mieux comprendre les phénomènes intervenant dans le déterminisme des qualités sensorielles et technologiques des viandes en fonction du sexe, de l'origine génétique ou du mode d'élevage de l'animal.

Des études pourraient, également, être réalisées sur la base des résultats obtenus par analyse en composantes principales pour déterminer avec précision des marqueurs protéiques de l'origine des animaux par dosages immunofluorescents des protéines impliquées dans le métabolisme de base (pour l'origine génétique) ou antioxydantes (pour les conditions

d'élevage). Ces marqueurs pourront ainsi servir d'alternative aux marqueurs génétiques couramment utilisés dans la traçabilité.

Enfin, aujourd'hui, des puces à ADN spécifiques du muscle squelettique porcin se mettent en place, ouvrant la voie au criblage plus global du transcriptome. Des études transcriptomiques pourraient ainsi être engagées pour évaluer les influences de différents facteurs de variation, et les liens entre ces expressions et les qualités de viandes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Alfonso L., Mourot J., Insausti K., Mendizabal J.A., Arana A. (2005). Description of growth, fat deposition, carcass and meat quality characteristics of Basque and Large White pigs. *Animal Research*. 54(1), p33-42.

Andres A.I., Cava R., Mayoral A. I., Tejeda J. F., Morcuende D., and Ruiz J. (2001). Oxidative stability and fatty acid composition of pig muscles as affected by rearing system, crossbreeding and metabolic type of muscle fibre. *Meat Science* 59, p39-47.

Ashgar A. and Bhatti A.R (1987). Endogenous proteolytic enzymes in skeletal muscle Their significance in muscle physiology and during postmortem aging events in carcasses. *Adv. Food Res*. 31, p343.

Bai Q., McGillivray C., Da Costa N., Dornan S., Evans G., Stear M. J., and Chang K. C. (2003). Development of a porcine skeletal muscle cDNA microarray: analysis of differential transcript expression in phenotypically distinct muscles. *BMC Genomics* 4, p8.

Balaban R.S. (1990). Regulation of oxidative phosphorylation in the mammalian cell. *American Journal of Physiology*. 90, pC377-C389.

Barany M. (1967). ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J Gen Physiol*, 50, Suppl:197-218.

Barton-Gade P. and Blaabjerg L.O. (1989) Preliminary observations on the behaviour and meat quality of free range pigs. *International Congress of meat Science Technology*. 35, p1002-1005.

Bee G., Guex G. and Herzog W. (2004) Free range rearing of pigs during the winter: adaptation in muscle fiber characteristics and effects on adipose tissue composition and meat quality traits. *Journal of Animal Science*. 82, p1206-1218.

Bendall J.R. (1973). Post-mortem changes in muscle. *Academic Press*.

Bendall J.R. and Wismer-pedersen J. (1962) Some properties of the fibrillar proteins of normal and watery pork muscles. *Journal of food science*. 27, p144-157.

Bernard C., Cassar-Malek I. and Hocquette J-F. (2006). Genomic marker for meat tenderness. *Brevet 06 300943.5*. Déposé le 12 septembre 2006.

- 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), p5229-5237.
- Bonneau A.M. and Sonnenberg N. (1987). Involvement of the 24-kDa cap-binding protein in regulation of protein synthesis in mitosis. *Journal of Biological Chemistry*. 262, p11134-11139.
- Both G.W., Banerjee A.K. and Shatkin A.J. (1975). Methylation-dependent translation of viral messenger RNAs in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 72, p1189-1193.
- Bradshaw R.H., Parrott M. L., Forsling J. A., Goode D., Lloyd M., Rodway R. G. and Broom D. M. (1996). Stress and travel sickness in pigs: Effects of road transport on plasma concentrations of cortisol, beta-endorphin and lysine vasopressin. *Animal Science*. 63(3), p507-516.
- Brooke M.H. and Kaiser K.K. (1970). Three 'myosin adenosine triphosphatase' systems: the nature of their lability and sulfhydryl dependence. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 18, p670-672.
- Brown S. N., Warriss P. D., Nute G. R., Edwards J. E. and Knowles T. G. (1998). Meat quality in pigs subjected to minimal preslaughter stress. *Meat Science*. 49(3), p257-265.
- Burke R.E., Levine D.N., Tsairis P. and Zajac F.E. (1973). Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *Journal of Physiology*. 234(3), p723-748.
- 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, p367-381.
- Candek-Potokar M., Zlender B. and Bonneau M. (1998). Effects of breed and slaughter weight on longissimus muscle biochemical traits and sensory quality in pigs. *Ann. Zootech.* 47, p3-16.
- Caponigro G. and Parker R. (1996). Mechanisms and control of mRNA turnover in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Review*. 60, p233-249.
- Carpentier A., Latouche K. and Rainelli P. (2003). Les attributs de la viande de porc et la demande des consommateurs français. *Journée de la Recherche Porcine*. 35, p229-234.

Channon H. A., Payne A. M. and Warner R. D. (2003). Effect of stun duration and current level applied during head to back and head only electrical stunning of pigs on pork quality compared with pigs stunned with CO₂. *Meat Science*. 65(4), p1325-1333.

Chatterton T.A., Reynolds C.H., Lazarus N.R. and Pogson C.I. (1984). The role of phosphoenolpyruvate in insulin secretion: the effect of L-phenylalanine. *Cell. Mol. Life Sci.* 40(12).

Chen G., Gharib T. G., Huang C. C., Taylor J. M. G., Misek D. E., Kardia S. L. R., Giordano T. J., Iannettoni M. D., Orringer M. B., Hanash S. M. and Beer D. G. (2002). Discordant Protein and mRNA Expression in Lung Adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics*. 1(4), p304-313.

Chevillon P., Vautier A., Guillard A.S., Gilbert E., Leuret B., Terlouw C., Foury A. and Mormede P. (2005). Modes d'élevage alternatifs des porcs : 1. Effet sur les performances de croissance et les qualités des carcasses et des viandes et l'aptitude à la transformation en jambons cuits et secs. *Journées de la Recherche Porcine*. 37, p81-90.

Coutinho L.L., Bergen W.G., Romsos D.R. and Merkel R.A. (1993). Alpha-2 adrenergic receptor activity in porcine adipocytes is androgen and age/cell size dependent. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol*. 105, p333-339.

Craig E. A., Ingolia T. D. and Manseau L. J. (1983). Expression of Drosophila heat-shock cognate genes during heat shock and development. *Developmental Biology*. 99(2), p418-426.

Damon M., Liaubet L., Vincent A., Herpin P. and Hatey F. (2002). *Viandes Prod. Carnés, Hors Série*, p139-140.

Davey C.L., Kuttel H. and Gilbert K. V. (1967). Shortening as a factor in megeing. *Int. J. Food Sci. Tech.* 2, p53-56.

De Nobel H., Lawrie L., Brul S., Klis F., Davis M., Alloush H. and Coote P.. (2001). Parallel and comparative analysis of the proteome and transcriptome of sorbic acid-stressed *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 18, p1413-28.

Deiss V. Astruc T., Ferreira C. and Terlouw C. (2006). Anesthésie gazeuse des porcs: Réponses physiologiques et comportementales à différents mélanges gazeux. *Viandes et produits carnés*. 25(3), p71-82.

- Diesbourg L. Swatland H.J. and Millman B.M. (1988). X-ray diffraction measurements of postmortem changes in the myofilament lattice of pork. *Journal of Animal Science*. 66, p1048-1054.
- 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, p387-399.
- D'Souza D.N., Dunshea F.R., Leury B.J. and Warner R.D. (1999). Effect of mixing boars during lairage and pre-slaughter handling on pork quality. *Australian Journal of Agricultural Research*. 50, p109-113.
- Duncan R.F. and Hershey J.W. (1989). Protein synthesis and protein phosphorylation during heat stress, recovery, and adaptation. *Journal of Cell Biology*. 109, p1467-1481.
- Duncan R., Milburn S.C. and Hershey J.W. (1987). Regulated phosphorylation and low abundance of HeLa cell initiation factor eIF-4F suggest a role in translational control. Heat shock effects on eIF-4F. *Journal of Biological Chemistry*. 262, p380-388.
- Edwards S.A. (2005). Product quality attributes associated with outdoor pig production. *Livestock Production Science*. 94, p5-14.
- Eikelenboom G. and Hoving-Bolink A. H. (1997). The effect of ultimate pH on eating quality of pork. *Fleischwirtsch*. 76, p517-518.
- Eikelenboom G. and Minkema D. (1974). Prediction of pale, soft, exudative muscle with a non-lethal test for the halothane-induced porcine malignant hyperthermia syndrome. *Tijdschr. Diergeneesk*. 99, p421.
- Enfalt A. C., Lundstrom K., Hansson I., Lundeheim N. and Nystrom P. E. (1997). Effects of outdoor rearing and sire breed (Duroc or Yorkshire) on carcass composition and sensory and technological meat quality. *Meat Science*. 45(1), p1-15.
- Essen-Gustavsson B. and Tesch P.A. (1990). Glycogen and triglyceride utilization in relation to muscle metabolic characteristics in men performing heavy - resistance exercise. *European journal of applied physiology and occupational physiology*. 61(1-2), p5-10.

Estrada M., Varshney A. and Ehrlich B. E., (2006). Elevated Testosterone induces apoptosis in neuronal cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 281(35), p25492-25501.

Estrade M., Rock E. and Vignon X. (1991). Ultrastructural post-mortem changes in myofibrillar structure of normal and halothane sensitive pigs. *37th International Congress of Meat Science and Technology Kulmbach, Germany*.

Estrade M., Vignon X. and Monin G. (1993). Effect of the RN- Gene on Ultrastructure and Protein Fractions in Pig Muscle. *Meat Science*. 35(3), p313-319.

Fennema O.R. (1985). *Food Chemistry*. 2nd ed. New York : Marcel Dekker, Inc. 991 p.

Fernandez X., Magard M. and Tornberg E. (1992). The variation in pig muscle glycolytic potential during lairage-an in-vivo study. *Meat Science*. 32, p81-91.

Fernandez X., Meunier-Salaün M. C. and Ecolan P.. (1994). Glycogen depletion according to muscle and fibre types in response to dyadic encounters in pigs (*Sus scrofa domesticus*) - relationships with plasma epinephrine and aggressive behaviour. *Comp. Biochem. Physiol.* 4, p869-879.

Fernandez X., Neyraud E., Astruc T. and Sante V. (2002). Effects of halothane genotype and pre-slaughter treatment on pig meat quality. Part 1. Post mortem metabolism, meat quality indicators and sensory traits of m. Longissimus lumborum. *Meat Science*. 62(4), p429-437.

Fernandez C. and Sainz R.D. (1997). Pathways of protein degradation in L6 myotubes (44092). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 214, p242.

Fritz J.D. and Greaser M.L., (1991). Changes in titin and nebulin in *post-mortem* bovine muscle revealed by gel electrophoresis, Western blotting and immunofluorescence microscopy. *J. Food Sci.* 56, p607.

Fry A.C., Allemeier C.A. and Staron R.S. (1994). Correlation between percentage fibre type area and myosin heavy chain content in human skeletal muscle. *Eur. J. Appl. Physiol.* 68, p246-251.

Gandemer G., Pichou D. and Bouguennec B. (1990). Effects of rearing system and genotype on the chemical composition and sensory quality of the longissimus dorsi muscle of pigs. *Journées de la Recherche Porcine en France*. 22, p101-110.

Gardner MA., Huff-Lonergan E. and Lonergan SM. (2005). Prediction of Fresh Pork Quality using Indicators of Protein Degradation and Calpain Activation. *Proceedings, International Congress of Meat Science and Technology*. Baltimore, USA.

Garnett R.A.F., O'Donovan M.J., Stephens J.A. and Taylor A. (1978) Motor unit organisation of human gastrocnemius. *Journal of Physiology*. 287, p33.

Gentry J-G., Mc Glone J-J., Miller M-F. and Blanton J-R. (2004). Environmental effects on pigs performance, meat quality and muscle characteristics. *Journal of Animal Science*. 82, p209-217.

Goerke C., Bayer M.G. and Wolz C. (2001). Quantification of bacterial transcripts during infection using competitive reverse transcription PCR and Lightcycler RT-PCR. *Clin. Diag. Labo. Immun.* 8, p279-282

González B., Hernando R. and Manso R. (2000). Stress proteins of 70 kDa in chronically exercised skeletal muscle. *Pflugers Arch*. 440, p42-9.

Griot B., Boulard J., Chevillon P. and Kerisit R. (2000). Reduire les points de sang sur la viande de porc: des restrainers a bande pour le bien-etre et la qualite de la viande. *Viandes Prod. Carnes*. 21, p91-97.

Gunawan A. M., Park S. K., Pleitner J. M., Feliciano L., Grant A. L. and Gerrard D. E.(2007). Contractile protein content reflects myosin heavy-chain isoform gene expression. *J. Anim Sci*. 85(5), p1247-1256.

Gygi S. P., Rochon Y., Franza B. R. and Aebersold R. (1999). Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*. 19, p1720-1730.

Haddock B. A. and Jones C. W. (1977). Bacterial respiration. *Bacteriol. Rev.* 41, p47-99.

Hambrecht E., Eissen J. J., Newman D. J., Smits C. H. M., den Hartog L. A. and Verstegen M. W. A. (2005). Negative effects of stress immediately before slaughter on pork quality are aggravated by suboptimal transport and lairage conditions. *J. Anim. Sci*. 83, p440-448.

Hatey F., Martin P., Douaire M., Le Gac F., Dambrine G., Herpin P. and Monget P., 2000. Le programme Asteroger : vers un outil multifonctionnel pour les productions animales. *INRA Production Animale. HS* octobre 2000, p175-180.

Hemsworth P.H., Barnett J. L., Hofmeyr C., Coleman G. J., Dowling S. and Boyce J. (2002). The effects of fear of humans and pre-slaughter handling on the meat quality of pigs. *Australian journal of agricultural research*. 53(4), p493-501.

Hernando R. and Manso R. (1997). Muscle fibre stress in response to exercise: synthesis, accumulation and isoform transitions of 70-kDa heat-shock proteins. *Eur J Biochem*. 243, p460-467.

Herrera-Mendez C.H., Brémaud L., Coulis G., Péliissier 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 letter*. 580(14), p3477-3484.

Hiremath L.S., Webb N.R. and Rhoads R.E. (1985). Immunological detection of the messenger RNA cap-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*. 260, p7843-7849.

Ho C.Y., Stromer M.H. and Robson R.N. (1994). Identification of the 30 kDa polypeptide in post mortem skeletal muscle as a degradation product of troponin T. *Biochimie*. 76, p369-375.

Holloszy J.O. and Booth F.W. (1976). Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. *Annu. Rev. Physiol*. 38, p273-291.

Huber L.A., Pfaller K. and Vietor I. (2003). Organelle proteomics: implications for subcellular fractionation in proteomics. *Circ Res*. 92, p962-968.

Huff-Lonergan E. and Lonergan S.M. (2005). Mechanisms of water-holding capacity of meat: the role of post-mortem biochemical and structural changes. *Meat Science*. 71, p194-204.

Huff-Lonergan E., Parrish F.C. and Robson R.M. (1995). Effects of postmortem aging time, animal age, and sex on degradation of titin and nebulin in bovine longissimus muscle. *J. Anim. Sci*. 73(4), p1064-1073.

Jacob F. and Monod J. (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology*. 3, p318-356.

Janss L. L. G., Van Arendonk J. A. M. and Brascamp E. W. (1994). Identification of a single gene affecting intramuscular fat in Meishan crossbreds using Gibbs sampling. *5th World Cong. Genet. Appl. Livest. Prod.* 18, p361-364.

Janss L. L. G.; VanArendonk J. A. M. and Brascamp E. W. 1997). Bayesian statistical analyses for presence of single genes affecting meat quality traits a crossed pig population. *Genetics*. 145(2), p395-408.

Jansson E. (1975). Type II fibers in human skeletal muscle: Biochemical characteristics and distribution. *Acta Physiologica Scandinavica*. 95, p47.

Jeremiah L. E., Gibson J. P., Gibson L. L., Ball R. O., Aker C. and Fortin A. (1999). The influence of breed, gender, and PSS (Halothane) genotype on meat quality, cooking loss, and palatability of pork. *Food Research International*. 32(1), p59-71.

Jeremiah L.E., Murray A.C. and Gibson L.L. (1990). The Effects of Differences in Inherent Muscle Quality and Frozen Storage on the Flavor and Texture Profiles of Pork Loin Roasts. *Meat Science*. 27, p305-327.

Johnson J. D. and Fleshner M. (2006). Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. *J Leukoc Biol*. 79(3), p425-434.

Jones R.M., Branda J., Johnston K.A., Polymenis M. et al. (1996). An essential E box in the promoter of the gene encoding the mRNA cap- binding protein (eukaryotic initiation factor 4E) is a target for activation by c-myc. *Molecular and Cellular Biology*. 16, p4754-4764.

Joo S. T., Kauffman R. G., Kim B. C. and Park G. B. (1999). The relationship of sarcoplasmic and myofibrillar protein solubility to colour and water-holding capacity in porcine longissimus muscle. *Meat Science*. 52(3), p291-297.

Kaczor J. J., Hall J. E., Payne E. and Tarnopolsky M. A. (2007). Low intensity training decreases markers of oxidative stress in skeletal muscle of mdx mice. *Free Radic Biol Med*. 43, p145-54.

Klont R.E., Brocks L. and Eikelenboom G. (1998) Muscle fiber type and meat quality. *Meat Science*. 49, p219-229.

Klont R.E. and Lambooy E. (1995). Effects of preslaughter muscle exercise on muscle metabolism and meat quality studied in anesthetized pigs of different halothane genotypes. *Journal of Animal Science*. 73, p108-117.

Knowles T.G. (1995). A review of post transport mortality among younger calves. *The veterinary record*. 137, p406-407.

Koohmaraie M., (1992). The role of Ca²⁺-dependent proteases (calpains) in post mortem proteolysis and meat tenderness. *Biochimie*. 74(6), p239-245.

Koohmaraie M., Whipple G., Kretchmar D.H., Crouse J.D. and Mersmann H.J. (1991). Postmortem proteolysis in longissimus muscle from beef, lamb and pork carcasses. *J. Anim. Sci.* 69 : 617.

Laborde D., Talmant A. and Monin G. (1985). Activités enzymatiques métaboliques et contractiles de 30 muscles du porc. Relations avec le pH ultime atteint après la mort. *Reprod. Nutr. Develop.* 25, p619-628.

Lafontan M. and Berlan M. (1995). Fat cell α 2-adrenoreceptors: the regulation of fat cell function and lipolysis. *Endocrine Reviews*. 16(6), p716-738.

Lahucky R.; Christian L. L.; Kovac L.; Stalder K. J. and Bauerova M. (1997). Meat quality assessed ante- and post mortem by different ryanodine receptor gene status of pigs. *Meat Science*. 47(3-4), p277-285.

Larzul C., Le Roy P., Monin G. and Sellier P. (1998). Variabilité génétique du potentiel glycolytique du muscle chez le porc. *INRA Prod. Anim.* 11, p183-197.

Larzul C., Le Roy P., Tribout T., Gogue J. and Sancristobal M. (2006). La sélection canalisante sur le pH ultime: Conséquences sur la qualité de la viande. *Journée de la Recherche Porcine*. 38, p105-110.

Latorre M.A., Lázaro R., Valencia D.G., Medel P. and Mateos G.G. (2004) The effects of gender and slaughter weight on the growth performance, carcass traits and meat quality characteristics of heavy pigs. *Journal of Animal Science*. 82, p526-533.

Laville E., Sayd T., Santé-Lhoutellier V., Morzel M., Labas R., Franck M., Chambon C. and Monin G. (2005). Characterisation of PSE zones in semimembranosus pig muscle. *Meat Science*. 70(1), p167-172.

Lawler J.M., Powers S. K., Visser T., Van Dijk H., Kordus M. J. and Ji L. L. (1993). Acute exercise and skeletal muscle antioxidant and metabolic enzymes: effects of fiber type and age. *Am. J. Physiol.* 265, pR1344-R1350.

Lawrie R.A. (1960). Post-mortem glycolysis in normal and exudative longissimus dorsi muscles of the pig in relation to so-called white muscle disease. *J. Comp. Pathol.* 170, p273-297.

Lawrie R.A. (1966) Metabolic stresses which affect muscle. *The Physiology and Biochemistry of Muscle as Food*. Chapitre 9. by Briskey E.J., Cassens R.G., and Trautman J. C. The University of Wisconsin Press, Madison.

Lawrie R.A. (1998). *Lawrie's Meat Science*. By Ralston Andrew Lawrie

Lawson M. A. (2004). The role of integrin degradation in post-mortem drip loss in pork. *Meat science.* 68, p559-566.

Le Roy P., Elsen J. M. and Naveau J. (1990). Study of adiposity genetic variability in the Laconie line. *Journée de la Recherche Porcine en France.* p2211-2216.

Lebret B., Lefaucheur L. and Mourot J. (1999). La qualité de la viande de porc. Influence des facteurs d'élevage non génétiques sur les caractéristiques du tissu musculaire. *INRA Prod. Anim.* 12, p11-28.

Lebret B., Massabie P., Granier R., Juin H., Mourot J. and Chevillon P. (2002). Influence of outdoor rearing and indoor temperature on growth performance, carcass, adipose tissue and muscle traits in pigs, and on the technological and eating quality of dry-cured hams. *Meat Science.* 62, p447-455.

Lebret B., Meunier-Salaün M.C., Foury A., Mormède P., Dransfield E. and Dourmad J.Y., (2006). Influence of rearing conditions on performance, behavioral and physiological responses of pigs to preslaughter handling, carcass traits and meat quality. *Journal of Animal Science.* 84, p2436-2447.

Lefaucheur L. (2003). Typologie et ontogénèse des fibres musculaires chez le porc. *Productions Animales.* 16, p133-136.

Lefaucheur L. and Ecolan P. (1998). Composition en chaînes lourdes de myosine des fibres musculaires de type II chez le porc. *INRA Production animales.* 11(2), p152-154.

Lewis P.K., Rakes L.Y., Noland P.R. and Brown C.J. (1987). The effect of DFD classification and internal cooking temperature on certain pork muscle characteristics. *Meat Science*. 21, p137-144.

Lindahl G., Lundström K. and Tornberg E.. (2001). Contribution of pigment content, myoglobin forms and internal reflectance to the colour of pork loin and ham from pure breed pigs. *Meat Science*. 59, p141-151.

Locke M., Atkinson B. G., Tanguay R. M. and Noble E. G. (1994). Shifts in type I fiber proportion in rat hindlimb muscle are accompanied by changes in HSP72 content. *Am J Physiol* 266:C1240-C1246.

Locker R.H. and Hagyard C.J. (1963). A cold shortening effect in beef muscles. *Journal Science Food Agriculture*. p787-793.

Mac Dougall D.B. (1970). Characteristics of the appearance of meat. I. The luminous absorption, scatter and internal transmittance of the lean of bacon manufactured from normal and pale pork. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 21(11), p568-571.

Mac Dougall D.B. (1982). Changes in the colour and opacity of meat. *Food Chemistry*. 9, p75-88.

Melody J. L., Lonergan S.M., Rowe L.J., Huiatt T.W., Mayes M.S. and Huff-Lonergan E. (2004). Early postmortem biochemical factors influence tenderness and water-holding capacity of three porcine muscles. *J. Anim. Sci.* 82, p1195-1205.

Mikami M, Whiting AH, Taylor MA, Maciewicz RA. and Etherington DJ., (1987). Degradation of myofibrils from rabbit, chicken and beef by cathepsin L and lysosomal lysates. *Meat Science*. 21, p81-97.

Milan D., Jeon J. T., Looft C., Amarger V., Robic A., Thelander M., RogelGaillard C., Paul S., Iannuccelli N., Rask L., Ronne H., Lundstrom K., Reinsch N., Gellin J., Kalm E., LeRoy P., Chardon P. and Andersson L. (2000). A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. *Science*. 288(5469), p1248-1251.

Minelli G., Culioli J. and Vignon X. (1995). Postmortem changes in the mechanical properties and ultrastructure of the longissimus in two porcine breeds. *Journal of Muscle Foods*. 6(4), p313 - 326.

Monin G. (2003). Abattage des porcs et qualités des carcasses de viandes. *INRA production animale*. 16, p251–262.

Monin G. (1973). Qualité de la viande et qualité des carcasses chez le porc. *Bull. Tech. CRZV*, Theix INRA, 13, p23-28.

Monin G. (1988). Stress d'abattage et qualités de la viande. *Rec. Méd. vét., Alfort*. 164, p835-842.

Monin G. (1989). Genetic effects on technological qualities of pig meat. *40th Ann. Meet. EAAP*, Dublin.

Monin G. and Ouali A. (1991). Muscle differentiation and meat quality. *Develop. Meat Sci.* 5, p89-157.

Monin G., Mejenes-quijano A., Talmant A. and Sellier P. (1987). Influence of breed and muscle metabolic type on muscle glycolytic potential and meat pH in pigs. *Meat Science*. 20, p149-158.

Morley S.J. and Traugh J.A. (1990). Differential stimulation of phosphorylation of initiation factors eIF- 4F, eIF-4B, eIF-3, and ribosomal protein S6 by insulin and phorbol esters. *Journal of Biological Chemistry*. 265, p10611-10616.

Morzel M. and Van de Vis H. (2003). Effect of the slaughter method on the quality raw and smoked eels. *Aquaculture Research* 34, p1-11.

Morzel M., Chambon C., Hamelin M., Santé-Lhoutellier V., Sayd T. and Monin G. (2004). Proteome changes during pork meat ageing following use two different pre-slaughter handling procedures. *Meat Science*. 67, p689-696.

Morzel M., Chambon C., Lefèvre F., Paboeuf G. and Laville, E. (2006). Modifications of Trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle proteins by preslaughter activity. *J. Agric. Food Chem.* 54, p2997-3001.

Mouroit J. and Kouba M. (1999). Effect of a high linoleic acid diet on lipogenic enzyme activities and on the composition of the lipid fraction of fat and lean tissues in the pig. *Meat Science*. 52(1), p39-45.

Müller E., Rutten M., Moser G., Reiner G., Bartenschlager H. and Geldermann H. (2002). Fibre structure and metabolites in *M.longissimus dorsi* of wild boar, pietrain and meishan pigs as well as crossbred générations. *Journal of animal breed genetical*. 119, p125-137.

Muthukrishnan S., Both G.W., Furuichi Y. and Shatkin A.J. (1975). 5'-Terminal 7-methylguanosine in eukaryotic mRNA is required for translation. *Nature*. 255, p33-37.

Nairn A.C., Bhagat B. and Palfrey H.C. (1985). Identification of calmodulin-dependent protein kinase III and its major Mr 100,000 substrate in mammalian tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82(23), p7939-7943.

Naveau J. (1986). Contribution à l'étude du déterminisme génétique de la qualité de la viande porcine. Héritabilité du rendement technologique Napole. *Journée de la recherche porcine*. 18, p265-276.

Ngapo T.M., Dransfield E., Martin J-F., Magnusson M., Bredhal L. and Nute G.R. (2004). Consumer perceptions: pork and pig production. Insights from France, England, Sweden and Denmark. *Meat Science*. 66(1), p125-134.

Nickerson, M., Kennedy, S.L., Johnson, J.D. and Fleshner, M. (2006). Sexual dimorphism of the intracellular heat shock protein 72 response. *J. Appl. Physiol*. 101, p566-575.

Nirenberg M. (1968) The genetic code. *Nobel Lecture*. p372-395.

Offer G. (1991). Modelling of the formation of pale, soft and exudative meat: effects of chilling regime and rate and extent of glycolysis. *Meat Science*. 30, p157-184.

Offer G. and Knight P. (1988). Structural basis of water - holding in meat. *Developments in meat science* edited by LAWRIE.

Offer G. and Cousins T. (1992). The mechanism of drip production: Formation of two compartments of extracellular space in muscle post-mortem. *J. Sci. Food Agric*. 58, p107-116.

Oishi Y., Taniguchi K., Matsumoto H., Ishihara A., Ohira Y. and Roy R.R. (2002). Muscle type-specific response of HSP60, HSP72, and HSC73 during recovery after elevation of muscle temperature. *J Appl Physiol*. 92, p1097-1103.

Ollivier L., Sellier P. and Monin G. (1976). Frequency of the malignant hyperthermia syndrome (MHS) in some french pigs populations: Preliminary results. *Proceedings of the Third International Conference on Production Disease in Farm Animals*. p208-210.

Ouali A. (1991). Conséquences des traitements technologiques sur la qualité de la viande. *INRA Prod. Anim.* 4, p195-208.

Ouali A. (1992). Proteolytic and physicochemical mechanisms involved in meat texture development. *Biochimie.* 74(3), p251-265.

Ouali A., Obléd A., Cottin P., Merdaci N., Ducastaing A. and Valin C. (1983). Comparative effects of post-mortem storage and low-calcium-requiring neutral proteinase on bovine and rabbit myofibrillar proteins. *J. Sci. Food Agric.* 34(5), p466-476.

Palmer JD. and Logsdon JM. (1991). The recent origins of introns. *Curr Opin Genet Dev.* 1, p470-477.

Paroo Z., Dipchand E.S. and Noble E.G. (2002). Estrogen attenuates postexercise HSP70 expression in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282, pC245-C251.

Paroo Z., Tiidus P.M. and Noble E.G. (1999). Estrogen attenuates HSP72 expression in acutely exercised male rodents. *Eur. J. Physiol.* 80, p180-184.

Perez M. P., Palacio J., Santolaria M. P., Acena M. C., Chacon G., Gascon M., Calvo J. H., Zaragoza P., Beltran J. A. and Garcia-Belenguer S. (2002). Effect of transport time on welfare and meat quality in pigs. *Meat Science.* 61(4), p425-433.

Peter J.B., Barnard R.J., Edgerton V.R., Gillespie C.A. and Stempel K.E. (1972) Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry.* 11 (14), p2627.

Petersen J. S., Henckel P., Maribo H., Oksbjerg N. and Sorensen M. T. (1997). Muscle metabolic traits, post mortem pH-decline and meat quality in pigs subjected to regular physical training and spontaneous activity. *Meat Science.* 46(3), p259-275.

Picard B., Jurie C., Cassar-Malek I. and Hocquette J.-F. (2003). Typologie et ontogenese des fibres musculaires chez le bovin. *INRA Prod. Anim.* 16, p125-131.

Pietrzak M., Greaser M.L. and Sosnicki A.A. (1997). Effect of rapid rigor mortis processes on protein functionality in pectoralis major muscle of domestic turkeys. *J Anim Sci.* 75, p2106-2116.

Plastow G. S., Carrion D., Gil M., Garci'a-Regueiro J. A., i Furnols M. F., Gispert M., Oliver M. A., Velarde A., Guardia M. D., Hortos M., Rius M. A., Sarraga C., Di'az I., Valero A., Sosnicki A., Klont R., Dornan S., Wilkinson J. M., Evans G., Sargent C., Davey G., Connolly D., Houeix B., Maltin C. M., Hayes H. E., Anandavijayan V., Foury A., Geverink N., Cairns M., Tilley R. E., Mormede P. and Blott S. C. (2005). Quality pork genes and meat production: 50th International Congress of Meat Science and Technology,(ICoMST), 8-13 August 2004, Helsinki, Finland. *Meat Science*. 70(3), p409-421.

Ranviér L. (1874) De quelques faits relatifs a l'histologie et a la physiologie des muscles striés. *Archives de Physiologie Normale et Pathologique*. 6, p1-15

Renand G., Larzul C., Le Bihan-Duval E. and Le roy P. (2003) L'amélioration génétique de la qualité de la viande dans les différentes espèces : situation actuelle et perspective à court et moyen terme. *INRA productions animales*. 16, p159-173.

Renner M. (1990). Reviews: Factors involved in the discoloration of beef meat. *International Journal of Food Science and Technology*. 25, p613-630.

Rubio-Gayosso I., Sierra-Ramirez A., Garcia-Vasquez A., Martinez-Martinez A., Munoz-Garcia O., Morato T. and Ceballos-Reyes G. (2000). 17- β -estradiol increases intracellular calcium concentration through a short-term and nongenomic mechanism in rat vascular endothelium in culture. *J. Cardiovascular Pharmacology*. 36, p196-202.

Ryazanov A.G. and Spirin A.S. (1990). Phosphorylation of elongation factor 2: a key mechanism regulating gene expression in vertebrates. *New Biol*.

Savage A.W.J., Wariss P. D. and Jolley P. D. (1990). The amount and composition of the proteins in drip from stored pig meat. *Meat Science*. 27, p289-303.

Sayd T., Mera T., Martin V. and Laville E. (1998). Spatial distribution of myosin heavy chain isoforms and lactate dehydrogenase M4 in the limb musculature of two crossbred lambs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 120, p153-163.

Sayd T., Morzel M., Chambon C., Franck M., Figwer P., Larzul C., Le Roy P., Monin G., Chérel P. and Laville E. (2006). Proteome analysis of the sarcoplasmic fraction of pig Semimembranosus muscle: *Implication on meat color development*. p2732-2737.

Sayre R.N., Briskey E.J. and Hoekstra W.G. (1963). Comparison of muscle characteristics and post mortem glycolysis in three breeds of swine. *J. Anim. Sci.* 22, p1012-1020.

Scott M. A., Locke M. and Buck L. T. (2003). Tissue-specific expression of inducible and constitutive Hsp70 isoforms in the western painted turtle. *J Exp Biol.* 206, p303-311.

Sellier P. (1998) Genetics of meat and carcass traits. *The genetics of the pig*, p1987.

Sellier P. and Monin G. (1994). Genetics of pig and meat quality. *Journal of Muscle Food.* 5, p187–219.

Sentandreu M.A., Coulis G. and Ouali A. (2002). Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Food Science and Technology.* 13, p400-421.

Shatkin A.J. (1976). Capping of eucaryotic mRNAs. *Cell.* 9, p645-653.

Shiaffino S. and Reggiani C. (1994). Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *Journal of American Physiological Society.* 77(2), p493–501.

Sigholt T., Erikson U., Rustad T., Johansen S., Nordtvedt T. S. and Seland A. (1997). Handling Stress and Storage Temperature Affect Meat Quality of Farmed-raised Atlantic Salmon (*Salmo Salar*). *Journal of Food Science.* 62(4), p898-905.

Sorger P. K. and Pelham H. R. (1987). Cloning and expression of a gene encoding hsc73, the major hsp70-like protein in unstressed rat cells. *EMBO J.* 6, p993-998.

Sosnicki A. A., Greaser M. L., Pietrzak M., Pospiech E. and Sante V. (1998). PSE-like syndrome in breast muscle of domestic turkeys: A review. *Journal of Muscle Foods.* 9(1), p13-23.

Stasyk T. and Huber L.A. (2004). Zooming in: fractionation strategies in proteomics. *Proteomics.* 4, p3704-3716.

Sudre K., Cassar-Malek I., Leroux C., Listrat A., Jurie C., Renand G., Martin P. and Hocquette J.F. (2002). Etude du transcriptome du muscle pour l'identification de gènes déterminant les caractéristiques musculaires et les qualités sensorielles de la viande bovine. *Viandes et Produits Carnés, hors série*, p111-112.

Takahashi K., Taira T., Niki T., Seino C., Iguchi-Arigo S. M. M. and Ariga H. (2001). DJ-1 positively regulates the androgen receptor by impairing the binding of PIASxα to the receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. p34556-37563.

Taylor R. G., Geesink G.H., Thompson V.F., Koohmaraie M. and Goll D.E. (1995). Is Z-Disk degradation responsible for postmortem tenderization. *J. Anim. Sci.* 73, p1351-1367.

Terlouw C., Astruc T., Deiss V. and Espinosa L. (2006). Anesthésie gazeuse des porcs : variations physiologiques et comportementales et qualité des viandes. *Journées Recherche Porcine* 38, p89-96.

Terlouw C., Ludriks A., Schouten W., Vaessen S., Fernandez X., Andanson S. and Pere M.C. (2001). Prédominance de l'allèle de sensibilité à l'halothane. *Viandes prod. Carnés*. 22 (5).

Terlouw C., Rybarczyk P., Fernandez X., Blinet P. and Talmant A. (1997). Comparaison de la réactivité au stress des porcs de races Large White et Duroc. *Journées Recherches Porcine en France* 29, p383-390.

Terlouw E.M.C. (2002). Stress des animaux et qualités de leurs viandes. Rôle du patrimoine génétique et de l'expérience antérieure. *INRA Prod. Anim.* 15(2), p125-133.

Terlouw E.M.C. and Rybarczyk P. (2008). Explaining and predicting differences in meat quality through stress reactions at slaughter: the case of Large White and Duroc pigs. *Meat Science* . In press

Trunkfield H. R. and Broom D. M. (1990). The welfare of calves during handling and transport. *Applied Animal Behaviour Science*. 28, p135-152.

Van Der Wal P.G. (1975). A comparison of physiological parameters after electroshock stunning and adrenaline (IV) administration. *21st EMMRW Berne*.

Van Der Wal P.G., Bolink A.H. and Markus G.S.M. (1988). Differences in quality characteristics of normal, PSE and DFD pork. *Meat Science*. 24, p79-84.

Varani G. (1997). A cap for all occasions. *Structure*. 5, p855-858.

Velarde A., Gispert M. and Faucitano L. (2001) Effects of the stunning procedure and the halothane genotype on meat quality and incidence of haemorrhages in pigs. *Meat Science*. 58(3), p313–319.

Vignerot P., Touraine B., Touraille C. and Prud'hon M. (1983). Influence du mode d'élevage sur la composition de la carcasse et les caractéristiques musculaires de l'agneau Mérinos d'Arles. *34th Ann. Meet. EAAP*.

Wagner P.D. and Weeds A.G. (1977). Studies on the role of myosin alkali light chains. Recombination and hybridization of light chains and heavy chains in subfragment-1 preparations. *J Mol Biol.* 109, p455-70.

Wall S.J. and Edwards D.R. (2002). Quantitative RT-PCR: A comparison of primer-dropping, competitive and real-time RT-PCRs. *Anal. Bioch.* 300, p269-273.

Wang Y-H., Byrne K.A., Reverter A., Harper G.S., Taniguchi M., Mac William S.M., Mannen H. Oyama K. and Lehnert S.A. (2005). Transcriptional profiling of skeletal muscle tissue from two breeds of cattle. *Mammalian Genome.* 16(3), p201-210.

Wang, X., Phelan S. A., Forsman-Semb K., Taylor E. F., Petros C., Brown A., Lerner C. P. and Paigen B. (2003). Mice with targeted mutation of peroxiredoxin 6 develop normally but are susceptible to oxidative stress. *J Biol Chem.* 278, p25179-25190.

Warriss P.D. (1987). The effect of time and conditions of transport and lairage on pig meat quality. 245 - 264. Evaluation and control of meat quality in pigs by Tarrant P.V., Eikelboom G., and Monin G.

Warriss P.D., Kestin S.C. and Robinson J.M. (1983). A note on the influence of rearing environment on meat quality in pigs. *Meat Science.* 9, p271-279.

Wotton S. B. and O'Callaghan M. (2002). Electrical stunning of pigs: the effect of applied voltage on impedance to current flow and the operation of a fail-safe device. *Meat Science.* 60(2), p203-208.

Youssao A.K.I., Verleyen V., Michaud C. and Leroy P. L. (2002). Composition de la carcasse, qualité de la viande et exploitation du Pietrain stress négatif. *Ann. Med. Vet.* 146, p329-338.

Sites internet:

<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>

<http://prowl.rockefeller.edu/prowl-cgi/profound.exe>

<http://www.agrisalon.com/06-actu/article-19718.php>

http://www.matrixscience.com/search_form_select.html

LISTE DES PUBLICATIONS

Publications scientifiques:

A. Kwasiborski, T. Sayd, C. Chambon, V. Santé-Lhoutellier, D. Rocha, C. Terlouw. (2008). Pig *Longissimus lumborum* proteome: Part I: Effects of genetic background, rearing environment and gender. *Meat Science*. doi:10.1016/j.meatsci.2008.04.028.

A. Kwasiborski, T. Sayd, C. Chambon, V. Santé-Lhoutellier, D. Rocha, C. Terlouw. Pig *Longissimus lumborum* proteome: Part II: Relationships between protein content and meat quality. *Meat Science*. doi:10.1016/j.meatsci.2008.04.032.

A. Kwasiborski, T. Sayd, C. Chambon, V. Santé-Lhoutellier, D. Rocha, C. Terlouw. Specific proteins allow classifying pigs according to sire breed, rearing environment and gender. *Livestock Science*. In press.

A. Kwasiborski, D. Rocha, C. Terlouw. Gene expression is little influenced by genetic and rearing aspects, but is correlated with variations in pork quality traits. *Animal Genetics*. Subm.

Posters:

A. Kwasiborski, T.Sayd, C.Chambon, V.Santé-Lhoutellier, D.Rocha and C.Terlouw.
Influence of gender, genetic background and rearing method on the relationship between protein expression and meat quality.
52^{ème} ICOMST, Dublin, Ireland

A. Kwasiborski, T.Sayd, C.Chambon, V.Santé-Lhoutellier, D.Rocha and C.Terlouw.
Relationships between protein expression and meat quality in pigs: influences of rearing environment and genetic background.
13^{ème} IUFOST, Nantes, France.

A. Kwasiborski, T.Sayd, C.Chambon, V.Santé-Lhoutellier, D.Rocha and C.Terlouw.
La carte protéique : un outil pour la détermination de marqueurs des qualités de la viande de porc.
11^{ème} JSMTV, Clermont-Ferrand, France.

A. Kwasiborski, T.Sayd, C.Chambon, V.Santé-Lhoutellier, D.Rocha and C.Terlouw.
Effet du sexe sur l'expression des protéines sarcoplasmiques.
11^{ème} JSMTV, Clermont-Ferrand, France.

A. Kwasiborski, T.Sayd, C.Chambon, V.Santé-Lhoutellier, D.Rocha and C.Terlouw.
Protéomique et qualités des viandes de porc.
Journées de l'école doctorale, Clermont-Ferrand, France.

Résumé

Avec une consommation de 19600 milliers de tonnes équivalent carcasses en 2005, la viande de porc est la plus consommée en Europe. Elle montre, toutefois, une forte variabilité, en partie due à des variations dans le métabolisme énergétique musculaire *post-mortem*. Celui-ci est défini comme l'ensemble des réactions biochimiques et leurs interactions survenant dans le muscle au cours de la période allant de la mort de l'animal jusqu'à la préparation de la viande avant consommation. De nombreux facteurs, dépendant de l'animal (génétique, mode d'élevage, alimentation, réactivité au stress d'abattage...) ou de la technologie (mode d'étourdissement...), peuvent influencer le métabolisme *post-mortem* et par conséquent, les qualités de viande.

Un plan expérimental 2x2x2 compare le protéome et l'expression de certains gènes d'intérêt chez des porcs femelles ou mâles castrés, de 2 origines génétiques différentes (pères Large White ou Duroc, mères Large White x Landrace), élevés dans 2 conditions différentes (conventionnelle en intérieur ou alternative en extérieur). Les résultats obtenus mettent en évidence l'important effet des facteurs de variation sur les quantités de protéines ainsi que sur les voies biochimiques impliquées dans le déterminisme des qualités des viandes. Ils ont également permis l'identification des marqueurs protéiques caractéristiques de l'origine génétique ou environnementale de l'animal. Les facteurs de variations n'influencent pas l'expression des gènes étudiés. Le déterminisme des qualités des viandes n'est probablement pas une conséquence des modifications dans le niveau d'expression des gènes, mais plutôt dans la régulation des processus traductionnels.

Mots clés : protéome, expression de gènes, qualités de viande, muscle *Longissimus*, porc.

Abstract

Pork is the most consumed meat in Europe with a mean consumption of 19 600 thousand ton of carcass equivalent in 2005. However, it shows that meat quality variability is in part due to variations in *post-mortem* muscular energy metabolism defined as whole biochemical pathways and their interactions occurring in muscle from the animal death to the consumption. Many factors depending of animals (genetic, rearing method, feeding, stress reactivity...) or technology (stunning...) can influence *post-mortem* metabolism and consequently meat quality.

A 2x2x2 factorial design compared proteome and some interesting gene expression in female or castrated males pigs, from 2 genetic background (Large White or Duroc sires, Large White x Landrace dams), and 2 rearing conditions (conventional indoors or alternative outdoors). Results underlined important effect of treatment factors on protein quantities and on biochemical pathways involved in meat quality. They allowed identification of specific proteins of genetic and rearing background. Treatment factors did not influence studied gene expression. Meat quality may not be a consequence of gene expression modifications, but a regulation of translational process.

Keywords: proteome, gene expression, meat quality, longissimus muscle, pig.