



HAL
open science

L'inactivation de la protéine hsp27 pour comprendre les mécanismes de tendreté de la viande bovine

Malek Kammoun, Brigitte Picard, Thierry Astruc, Christiane Barboiron, Christophe Chambon, Véronique V. Blanquet, Isabelle Cassar-Malek

► To cite this version:

Malek Kammoun, Brigitte Picard, Thierry Astruc, Christiane Barboiron, Christophe Chambon, et al.. L'inactivation de la protéine hsp27 pour comprendre les mécanismes de tendreté de la viande bovine. 15. Journées Sciences du Muscle et Technologies des Viandes, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). FRA., Nov 2014, Clermont-Ferrand, France. 204 p. hal-01211988

HAL Id: hal-01211988

<https://hal.science/hal-01211988v1>

Submitted on 3 Jun 2020

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.

L'inactivation de la protéine HSP27 pour comprendre les mécanismes de tendreté de la viande bovine

KAMMOUN M. (1,2), PICARD B. (1,2), ASTRUC T. (3), BARBOIRON C. (1,2), CHAMBON C. (4), BLANQUET V. (5), CASSAR-MALEK I. (1,2)

(1) INRA, VETAGRO SUP, UMR1213 HERBIVORES, F-63122 SAINT-GENES-CHAMPANELLE

(2) CLERMONT UNIVERSITE, VETAGRO SUP, UMR1213 HERBIVORES, BP 10448, F-63000 CLERMONT-FERRAND

(3) INRA, UR0370 QUALITE DES PRODUITS ANIMAUX, F-63122 SAINT-GENES-CHAMPANELLE

(4) INRA, PLATEFORME D'EXPLORATION DU METABOLISME F-63122 SAINT-GENES-CHAMPANELLE

(5) INRA, LIMOGES UNIVERSITE, UMR1061, F-87060 LIMOGES

isabelle.cassar-malek@clermont.inra.fr

Abstract

An HspB1-null mice to depict the implication of Hsp27 in tenderness

In order to examine the role of Hsp27 in the molecular mechanisms underlying tenderness, we generated an HspB1-null mouse (Kammoun et al., 2013). The mutant mouse was viable, fertile and showed neither apparent morphological nor anatomical alterations except the size that was transiently reduced compared to wild type. The macroscopic muscle phenotype was not altered. However, there were evidences for a muscle-type specific alteration of the molecular phenotype in relation to 1) apoptosis, Hsp status and anti-oxidant status in an oxidative muscle and 2) Hsp status and calcium homeostasis in a glycolytic muscle. Lastly, a preliminary transmission electron microscopy experiment revealed ultrastructural abnormalities in the myofibrillar structure of mutant mice. These data suggest that Hsp27 could directly impact the organisation of muscle cytoskeleton and contribute to the determinism of tenderness at the molecular and ultrastructural levels.

Introduction

La qualité sensorielle de la viande bovine est un critère important d'appréciation par les consommateurs qui demeurent insatisfaits en particulier de la tendreté. Celle-ci a une origine complexe et multifactorielle, qui la rend difficilement maîtrisable par la filière bovine. À l'issue de plusieurs années de recherche, notre équipe a établi une liste de biomarqueurs de la tendreté de la viande. Dans cette liste, les Heat Shock Proteins (Hsp) figurent à des « carrefours » biologiques dans l'interactome musculaire lié à la tendreté (Guillemin et al., 2011). Parmi elles, la protéine Hsp27 est différenciellement exprimée entre des muscles de tendreté extrême. Comprendre le rôle de Hsp27 et de ses interacteurs dans l'établissement de la tendreté est un des enjeux des recherches en production de viande. Afin d'atteindre cet objectif, nous avons produit une lignée de souris chez lesquelles le gène HspB1 (codant la protéine Hsp27) a été invalidé (Kammoun et al., 2013). Ce modèle a permis d'analyser le rôle de Hsp27 dans le développement et les caractéristiques du muscle, ainsi que sur la fonctionnalité de l'interactome impliqué dans les différences de tendreté.

Matériel et méthodes

L'invalidation du gène Hspb1 a été réalisée par recombinaison homologue (KO) chez la souris (en collaboration avec l'IGFL, le PBES Lyon et le plateau technique « Animalerie Rongeurs, mini-porc et gnotobiologie » de l'Inra de Theix). Des paramètres zootechniques (taille, poids, croissance) et physiologiques (mesure d'indicateurs plasmatiques) ont été suivis depuis la naissance jusqu'à 1 an. Les muscles *Soleus* et *Tibialis Anterior* ont été prélevés à 12 semaines d'âge pour une analyse immuno-histologique comme décrit dans Kammoun et al. (2014). Le muscle *Soleus* a été analysé en microscopie électronique à transmission au Centre d'Imagerie Cellulaire Santé de Clermont-Ferrand.

Afin de compléter la liste des interacteurs de la protéine Hsp27 et des gènes cibles de son inactivation susceptibles de participer à des différences de structure du muscle, une analyse bioinformatique sans *a priori* a été réalisée à l'aide du logiciel Pathway Studio suivie d'une analyse par Western-blot (Kammoun et al., 2013). Une analyse protéomique *du Tibialis Anterior* a été effectuée par électrophorèse bi-dimensionnelle couplée à l'identification des protéines sur la Plateforme d'Exploration du Métabolisme de l'Inra de Theix (Kammoun, 2013).

Résultats

Les souris KO sont viables, fertiles et ne présentent pas d'anomalies morphologiques ni anatomiques comparativement à leurs témoins. Elles ont toutefois un format plus petit jusqu'à 12 semaines (Kammoun et al., 2013). Au niveau plasmatique, une interaction génotype x âge x sexe a été révélée pour 16 paramètres biologiques sur les 36 indicateurs métaboliques. Les principales différences détectées entre KO et témoins suggèrent des différences de métabolismes hépatique et lipidique chez les mâles et de métabolisme du glucose et de l'acide urique chez les femelles à 12 semaines d'âge. Aucune différence n'a été observée pour les paramètres représentatifs du métabolisme musculaire.

La structure musculaire des animaux a été examinée au niveau histologique. Cette analyse n'a pas révélé de différences dans les caractéristiques des fibres musculaires (type contractile et métabolique, forme, périmètre, surface de section transversale) à l'exception d'une tendance à une proportion plus élevée de fibres de petite taille chez les souris KO.

Toutefois, l'analyse des profils électrophorétiques des isoformes de chaînes lourdes de myosine suggère un retard dans l'acquisition de leurs caractéristiques contractiles.

A l'échelle de l'ultrastructure examinée par microscopie électronique à transmission, les fibres des animaux KO présentent un appareil contractile moins organisé que celui des témoins (Figure 1) et qui est très déstructuré à 72h *post-mortem* (Figure 1).

Figure 1. Ultrastructure du muscle *Soleus* chez les KO comparativement aux témoins à T0 et T72 h *post-mortem*

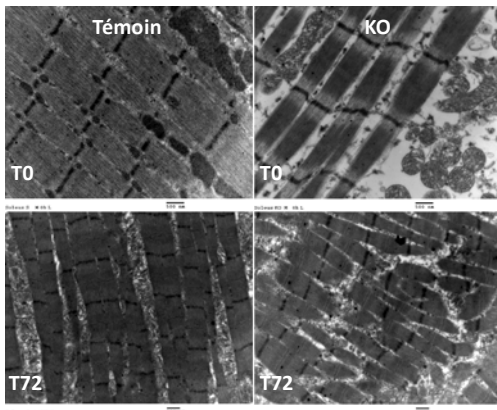


Tableau 1. Changement de l'abondance de protéines dans les muscles des souris KO comparativement à leurs témoins T

Protéine	Analyse bioinformatique et western-blot		Analyse protéomique	
	<i>m. Tibialis A</i>	<i>m. Soleus</i>	Protéine	<i>m. Tibialis A</i>
Hsp27	KO < T (-100%)	KO < T (-100%)	Hsp27	KO < T
Hsp20	KO ≈ T	KO < T (-45%)	Hsp70.9	KO < T
Cryab	KO ≈ T	KO > T (+37%)	Hsp70.8	KO < T
Hspbap1	KO ≈ T	KO ≈ T	Alb	KO > T
Hsp40	KO ≈ T	KO ≈ T	Tnnt3	KO > T
Hsp70a1a	KO ≈ T	KO > T (+33%)	Casq1	KO > T
Hsp90aa1	KO ≈ T	KO > T (+102%)	Srl (5 spots)	KO > T
Fas	KO ≈ T	KO > T (+76%)	Napa	KO > T
Chuk	KO ≈ T	KO ≈ T	Gmpr	KO > T
Sod1	KO ≈ T	KO > T (+24%)	Pdhb	KO > T
Casp3(17kDa)	KO < T (-22%)	KO > T (+54%)	Myh4	KO < T
Cyts	KO ≈ T	KO < T (-22%)	Ckm	KO < T
Eif4E	KO ≈ T	KO > T (+36%)	Tpi1	KO < T
Eif4G1	KO ≈ T	KO > T (+29%)	Park7	KO < T
Desmine	KO ≈ T	KO < T (-38%)	Ak1	KO < T
			Aldh2	KO > T
			Mdh1	KO > T
			Pygm	KO > T
			Dusp3	KO < T

L'abondance des partenaires ou cibles prédites de Hsp27 est modifiée chez les souris KO principalement dans le muscle *Soleus* (Tableau 1). Ces protéines sont impliquées dans différentes fonctions : Hsps (Hsp20, Cryab, Hsp70a1a et Hsp90aa1), régulateurs de l'apoptose (Fas, Chuk, et caspase-3), facteurs de traduction (Eif4E et Eif4G1), protéines du cytosquelette (Desmine) et antioxydants (Sod1). Dix-neuf protéines différemment abondantes entre souris KO et témoins ont été révélées par analyse protéomique dans le muscle *Tibialis Anterior* (Tableau 1). Ce sont principalement des Hsp (HspA9, HspA8), des enzymes du métabolisme musculaire (aldh2, mdh1, pdhb, ckm, Tpi), et des régulateurs du calcium (srl, casq1).

Discussion

Ces données montrent que l'inactivation constitutive de Hsp27 induit un phénotype macroscopique peu marqué, caractérisé par un format plus petit et un retard de développement musculaire, qui s'atténue avec l'âge. L'absence d'anomalies majeures et de différences dans le type contractile et métabolique laisse supposer que la déficience en Hsp27 est compensée par l'activité d'autres protéines (redondance des Hsp dans le muscle). En accord avec cette hypothèse, les souris KO diffèrent de leurs témoins par leur phénotype moléculaire, et ceci de façon muscle-spécifique, pour les protéines impliquées dans 1) l'apoptose, le statut en Hsp et le statut en antioxydants dans un muscle oxydatif (*m. Soleus*) et 2) le statut en Hsp et l'homéostasie du calcium dans un muscle glycolytique (*m. Tibialis Anterior*). Les phénomènes d'apoptose et de protéolyse calcium-dépendante seraient plus accentués chez les souris KO.

L'analyse préliminaire réalisée par microscopie électronique a révélé une désorganisation de l'ultrastructure des myofibrilles chez les souris KO. Ceci pourrait résulter de l'action d'un ensemble de phénomènes comme l'apoptose et la protéolyse conduisant à la fragilité du cytosquelette musculaire en l'absence de Hsp27. L'appareil contractile moins protégé par les Hsp serait aussi moins résistant à la dégradation *post-mortem*. Contrairement à ce qui a été observé pour les caractéristiques macroscopiques des souris et des muscles, aucun phénomène de compensation de l'absence de Hsp27 ne semble exister pour les propriétés ultrastructurales. Bien que ces résultats restent à confirmer, cette étude démontre le rôle crucial de la protéine Hsp27 dans l'organisation et la protection de l'appareil contractile myofibrillaire. Le phénotype fin (échelle moléculaire et ultrastructure) du muscle est donc dépendant de l'expression constitutive de la protéine. Il est favorable à un processus de transformation *post-mortem* propice à la tendreté.

Conclusion

L'ensemble des données issues de cette étude dans une espèce modèle apporte un nouvel éclairage sur les mécanismes moléculaires impliqués dans l'établissement de la tendreté de la viande bovine. Elle suggère que le statut en Hsp, les processus apoptotiques et la protection contre le stress oxydatif contribuent à l'évolution de l'ultrastructure *post-mortem* des muscles et à la tendreté de la viande. Ces nouvelles connaissances seront validées ultérieurement sur muscle bovin.

Références bibliographiques

- Guillemin N., Bonnet M., Jurie C., Picard B., 2011. *J. Proteomics*, 75, 352-365.
 Kammoun M., 2013. Thèse d'Université. Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé. Université Blaise Pascal, p. 112.
 Kammoun M., Cassar-Malek I., Meunier B., Picard B., 2014. *Eur. J. Histochem.*, 58, 2254.
 Kammoun M., Picard B., Henry-Berger J., Cassar-Malek I., 2013. *Comput Struct Biotechnol J.*, 6(7), e201303008.