



UNIVERSITE FRERES MENTOURI CONSTANTINE 1

**INSTITUT DE LA NUTRITION, DE L'ALIMENTATION
ET DES TECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES (INATAA)**



N° d'ordre :.....

N° de série :.....

Thèse de Doctorat en Sciences
Spécialité : Sciences Alimentaires

Présentée par

Yasmine BOUDIDA

**Marqueurs biologiques de la qualité de la viande :
mise en évidence de l'ubiquité du phénomène
d'apoptose chez différentes espèces bouchères
et étude de l'activité inhibitrice des serpines bovines**

Soutenue le : 16 / 10 / 2017

Devant le Jury composé de :

<u>Président :</u>	Pr. ADAMOUC A.	Université Kasdi Merbah Ouargla
<u>Directeur de thèse :</u>	Pr. BOUDJELLAL A.	INATAA - UFMC1
<u>Examineurs :</u>	Dr. BENATALLAH L.	INATAA-UFMC1
	Pr. AMIALI M.	ENSA Elharrach Alger
	Pr. DJENANE D.	Université Mouloud Mammeri Tizi Ouzou

Remerciements

J'adresse tout d'abord mes remerciements à **M. ADAMOU A.**, Professeur à l'Université Kasdi Merbah Ouargla, pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury ainsi qu'à Madame et Messieurs les membres du jury ayant accepté de consacrer de leur temps pour juger ce travail. Je cite :

- **BENATALLAH L.**, Maître de Conférences à l'Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires/Université Frères Mentouri Constantine 1

- **DJENANE D.**, Professeur à l'Université Mouloud Mammeri (Tizi Ouzou)

- **AMIALI M.**, Professeur à l'École Nationale Supérieure d'Agronomie (El Harrach, Alger)

A M. BOUDJELLAL A., Professeur à l'Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires/Université Frères Mentouri Constantine 1, j'adresse mes remerciements pour sa direction avec bienveillance de mon travail. Merci de m'avoir guidée et orientée tout au long de ma thèse. Je vous sais gré de la confiance que vous m'avez accordée ainsi que de votre disponibilité et de votre soutien indéfectible.

J'exprime ma profonde reconnaissance aux chercheurs et collègues de l'INRA de THEIX France, pour la qualité de leur accueil, la transmission de leurs compétences. J'y ai rencontré des personnes formidables qui ont accepté de m'apporter leur aide. Je pense notamment à Ahmed Ouali, Laurent Aubry, Thierry Astruc, et Thierry Sayd.

Je tiens à adresser ma vive gratitude à **M^{me}. BECILA S.**, Maître de Conférences à l'INATAA-Université Frères Mentouri Constantine 1, pour avoir participé fervemment à l'encadrement de mon travail. Merci infiniment de m'avoir accompagnée, soutenue et encouragée tout au long de la thèse tant sur le plan scientifique que personnel. Je n'oublierai jamais ton investissement scientifique auprès de moi durant toutes ces années. Si tant est qu'ils existent, les moments de doute ont été surpassés grâce à ta bonne humeur et à ton enthousiasme. Force est de dire que ta présence a marqué ce long parcours et cette éreintante traversée du Rubicon.

Je remercie tout particulièrement **M. SENTANDREU M.A.**, Directeur de recherche à l'Institut de l'agrochimie et de la technologie alimentaire (IATA) Espagne, pour m'avoir permis de mener à bien la partie expérimentale. Merci pour votre aide précieuse.

Mes vifs remerciements vont pour **M. ABDELLOUCHE D.**, Professeur en Anatomie pathologique au Centre Hospitalo Universitaire (CHU) de Sétif, qui m'a accompagnée dans l'aboutissement de la partie immunohistochimique de ce travail en me permettant de réaliser des coupes de tissus musculaires au sein du laboratoire d'Anatomie Pathologique du (CHU) de Sétif.

Je souhaite également remercier **M. KHELIFI D.**, Professeur à l'Université Frères Mentouri Constantine 1, pour les échanges scientifiques fructueux ainsi que pour son soutien.

Je suis reconnaissante à **M^{me}. DAHEL-MEKHANCHA C.C.**, Professeur à l'Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires/Université Frères Mentouri Constantine 1. Vous avez été là à nous guider depuis notre parcours de Magister à ce jour. Vous m'avez été d'un grand soutien dans des moments très éprouvants et de doute. Merci de m'avoir aidé à surmonter et à reprendre confiance.

Je me dois d'exprimer ma reconnaissance à **M. MEKHANCHA D. E.**, Enseignant/Chercheur à l'Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires/Université Frères Mentouri Constantine 1. Vous, Monsieur, qui étiez toujours là érigé tel un principe non seulement à pourfendre vigoureusement les errances, voire même les insuffisances dont peut se targuer un "apprenti-chercheur" mais aussi à inculquer la rigueur scientifique caractérisant un chercheur sérieux. Merci de m'avoir transmis vos qualités scientifiques et d'avoir partagé vos valeurs humaines.

C'est avec la même verve que je désire adresser les plus sincères remerciements à tous mes collègues et ami(e)s ainsi qu'à toutes les personnes qui m'ont aidée et soutenue de près ou de loin pour l'aboutissement de ce travail.

Enfin, c'est avec beaucoup d'émotion que j'exprime toute ma gratitude et ma reconnaissance à ma famille, et tout particulièrement à mes très chers parents. Merci de m'avoir bousculée, soutenue et encouragée durant toutes ces années avec beaucoup d'amour. *Je vous aime !*

Pasmine Boudida

Table des matières

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

INTRODUCTION GENERALE	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	4
PREAMBULE.....	3

Chapitre I : MARQUEURS BIOLOGIQUES DE LA TENDRETE DE LA VIANDE

I.1- Transformation du muscle en viande	4
I.1.1- Phase de mort cellulaire programmée (MCP).....	4
I.1.2- Phase d'installation de la rigidité cadavérique	5
I.1.3- Phase de la maturation	6
I.2- Evolution du pH <i>post-mortem</i>.....	7
I.3- Marqueurs biologiques de la tendreté de la viande.....	8
I.3.1- Rappel sur les événements majeurs survenant après la saigné de l'animal	9
I.3.2- Biomarqueurs potentiels de la tendreté de la viande	10
I.3.2.1- Marqueurs de la voie métabolique énergétique glytolytique	11
I.3.2.2- Marqueurs de la voie métabolique énergétique oxydative.....	13
I.3.2.3- Marqueurs impliqués dans la détoxification cellulaire	14
I.3.2.4- Marqueurs de la famille des protéines de choc thermique.....	15
I.3.2.5- Protéines anti-oxydantes comme marqueur de la tendreté.....	17
I.3.2.6- Protéases et inhibiteurs de protéases comme marqueurs de la tendreté de laviande	17
I.3.3- Perspectives d'avenir dans la recherche des prédicteurs de la tendreté de la viande	18

Chapitre II : APOPTOSE ET SCIENCE DE LA VIANDE

II.1- Apoptose ou Mort Cellulaire Programmée (MCP)	20
II.2-Apoptose et autres types de morts cellulaires	21
II.3- Caractéristiques de l'apoptose.....	23
II.4- Schéma général de l'apoptose	23
II.4.1- La voie extrinsèque.....	26
II.4.2- La voie intrinsèque	27

II.5-Mise en place de l'apoptose post-mortem et conséquences.....	28
II.5.1- Dégradation de l'actine.....	30
II.5.2- Externalisation des phosphatidylsérines.....	31

Chapitre III : SERPINES ET PREDICTION DE LA TENDRETE DE LA VIANDE

III.1- Propriétés générales des serpinines.....	34
III.1.1- Structure des serpinines	34
III.1.2- Différentes conformations des serpinines	36
III.2- Mécanismes d'inhibition des serpinines	38
III.2.1- Boucle d'inhibition <i>Reactive Center Loop</i> (RCL)	38
III.2.2- Inhibition de type « suicide »	38
III.2.3- Inhibition croisée ou « cross-class inhibition ».....	41
III.3- Fonctions biologiques des serpinines bovines dans le muscle.....	42

MATERIELS ET METHODES 44

PREAMBULE.....	44
----------------	----

Chapitre I : UBIQUITE DU PHENOMENE D'APOPTOSE CHEZ DIFFERENTES ESPECES BOUCHERES

I.1- Mise en évidence de la dégradation d'actine chez plusieurs espèces bouchères.....	45
I.1.1- Matériel biologique	45
I.1.2- Préparation des extraits des différents muscles	47
I.1.3- Dosage des protéines par la méthode Bradford	49
I.1.4- Electrophorèse et Western Blot	49
I.1.4.1- Coloration des gels	52
I.1.4.2- Révélation de la dégradation d'actine par Western Blot	53
I.1.4.3- Lecture des gels colorés de l'électrophorèse et des films du WesternBlot.....	55
I.2- Mise en évidence de l'inversion de la polarité de la membrane cellulaire chez <i>Cyprinus carpio</i>	57
I.2.1- Matériel biologique.....	57
I.2.2- Marquage à l'annexine V.....	58
I.2.3- Double marquage de la laminine	59

I.3-Mise en évidence de la dégradation d'actine et de la libération mitochondriale du cytochrome c au cours du temps post mortem chez Cyprinus carpio	60
I.3.1-Matériel biologique	60
I.3.2- Mesure du pH.....	60
I.3.3- Extraction des protéines myofibrillaires	60
I.3.4- Dosage des protéines par la méthode Bradford	61
I.3.5- Séparation des PMF par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)	62
I.3.6- Révélation de la dégradation d'actine et libération du cytochrome c par Western Blot	62

Chapitre II : ACTIVITE INHIBITRICE DES SERPINES A3 BOVINES

II.1- Purification	64
II.2- CARACTERISATION DES INHIBITEURS	69
II.2.1- Dosage des protéines	69
II.2.2- Détermination du poids moléculaire par méthodes électrophorétique	70
II.2.3- Caractérisation par Western Blot.....	71
II.2.4- Mesure des activités inhibitrices	71
II.2.5- Caractérisation cinétique des inhibiteurs.....	76
II.2.5.1- Détermination de la constante de vitesse d'association (K_{ass})	78
II.2.5.2- Réalisation des courbes d'inhibition avec les peptidases à sérine et à cystéine.....	79
II.3- Analyse protéomique par électrophorèse bidimensionnelle (2-DE).....	80
II.4- Identification par spectrométrie de masse.....	84
II.4.1- Empreinte peptidique massique (EPM) par MALDI-ToF.....	84
II.4.2- EPM par spectrométrie de masse MS/MS.....	89
RESULTATS - DISCUSSIONS	91

Partie I : UBIQUITE DU PHENOMENE D'APOPTOSE CHEZ DIFFERENTES ESPECES BOUCHERES

PRÉAMBULE.....	91
----------------	----

Communication affichée: « APOPTOSE : processus précoce après la mort »	92
Publication n°01: Highlighting the Degradation of Actin in <i>Longissimus dorsi</i> Muscle of Different Species: Bovine, Ovine, Caprine, Poultry and Freshwater Fish.....	93
PRÉAMBULE.....	101
Publication n°02: Muscle to meat conversion in common carp (<i>cyprinus carpio</i>): new insights involving apoptosis.	102

**Partie II : CARACTERISATION DES SERPINES BOVINES ET LEUR ROLE
POTENTIEL DANS LA REGULATION DE L’APOPTOSE DANS LE MUSCLE POST
MORTEM- Résultats concernant le rôle des serpinines bovines dans la régulation du
processus apoptotique**

PRÉAMBULE.....	106
Publication n°03: Serine Protease Inhibitors as Good Predictors of Meat Tenderness: Which Are They and What Are Their Functions?	108
II.1- Constantes de vitesse d’association (K_{ass}) entre serpinines et enzymes cibles	124
II.2- Capacité à former des complexes enzyme inhibiteur stables en SDS	125
II.3- Fonctions biologiques possibles de Bov-serpinA 3	126
II.4- Implication des bovSERPINA3s dans le processus apoptotique	127
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	130
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	133
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	153

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AMC : Amino 4-MethylCoumarine
ARN : Acide ribonucléique
AT-III : Antithrombine III
ATP, ADP : Adénosine triphosphate, adénosine diphosphate
bp, kp : paire de bases, kilo paire de bases
Bis-Tris : Bis(2-hydroxyéthyl)imino-tris(hydroxyméthyl)méthane
BSA : Sérumalbumine bovine
Cbz : Carbobenzyloxy
CHAPS : 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate
Da, kDa : Dalton, kiloDalton
DEAE : DiEthylAminoEthyl
DMSO : Diméthylsulfoxyde
D.O. : Densité optique
DTT : Dithiothréitol
EDTA : Acide EthylèneDiamineTétraacétique
ELISA : Enzyme-LinkedImmunoSorbentAssay
FITC : Isothiocyanate de fluorescéine
FPLC : FastProteinLiquidChromatography
HEPES : N-(2-hydroxyéthyl)piperazine-N'-(2-éthanesulfonate) de sodium ; 4-(2-hydroxyéthyl)piperazine-1-(2-éthanesulfonate) de sodium
FPLC : Fast Performance Liquid Chromatography
HSP : « Heat-shock protein »
IAP : Inhibitor of Apoptosis
IgG : Immunoglobuline de classe G
k_{ass} : Constante de vitesse d'association
k_{diss} : Constante de vitesse de dissociation
K_i : Constante d'inhibition
MCE : 2-mercapto-éthanol
NADH : Nicotinamide adénin edinucléotide réduit
PAGE : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
PBS : Phosphate Buffered Saline
PCR : Réaction de polymérisation en chaîne
pI : Point isoélectrique
PM : Poids moléculaire
PVDF : Difluorure de polyvinylidène
RCL, RSL : Reactive Centre Loop, Reactive Site Loop
RT-PCR : Transcription inverse par PCR
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
SI : Stœchiométrie d'inhibition
TEMED : N, N, N', N'-tétraméthyléthylènediamine
Tris : Tris(Hydroxyméthyl)-aminométhane
Tween-20 : Polyéthylèneglycol sorbitan monolaurate

Liste

des figures et tableaux

LISTE DES FIGURES

FIGURE 01 : Etapes de transformation du muscle en viande	4
FIGURE 02 : Evénements majeurs survenant dans le muscle <i>post mortem</i>	10
FIGURE 03 : Les trois principaux types de mort cellulaire : apoptose, autophagie et nécrose ..	22
FIGURE 04 : Schéma général de l'apoptose avec les différentes voies	24
FIGURE 04* : Les caspases humaines	25
FIGURE 05 A : Structure des caspases.....	26
FIGURE 05 B : Mode d'activation des caspases	26
FIGURE 06 : Rôle des mitochondries dans l'apoptose	28
FIGURE 07 A : Schéma de la structure d'une serpine	35
FIGURE 07 B : Structure et conformation de la serpine	35
FIGURE 08 : Représentation structurale des conformations δ	37
FIGURE 09 : Mécanisme d'inhibition des serpines	40
FIGURE 10 : Structure du complexe α 1 antitrypsine-trypsine.....	41
FIGURE 11 : Présentation du muscle <i>Longissimus dorsi</i> des différentes espèces	46
FIGURE 12 : Protocole d'extraction des protéines myofibrillaires (Zamora, 1997 modifié)	48
FIGURE 13 : Dispositif électrophorétique	51
FIGURE 14 : Appareil de transfert et « sandwich » de transfert pour le Western Blot sous une tension de 10 V.....	54
FIGURE 15 : Principe de calcul des poids moléculaires	56
FIGURE 16 : Extraction des protéines myofibrillaires).....	61
FIGURE 17 : Préparation de l'extrait brut à partir du muscle Diaphragma de bovin	66

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Marqueurs potentiels de tendreté appartenant à la voie glycolytique.....	12
Tableau 2 : Marqueurs potentiels de tendreté impliqués dans la voie aérobie.....	14
Tableau 2 : Marqueurs potentiels de tendreté impliqués dans la détoxification cellulaire	15
Tableau 4 : Les HSP comme marqueurs potentiels de tendreté.....	16

Introduction

La maturation des viandes, période pendant laquelle s'élaborent les qualités organoleptiques du produit final, prend en compte l'évolution positive et négative de ces caractéristiques et les mécanismes qui y contribuent. Parmi ces qualités, la tendreté, et de façon plus générale la texture de la viande, reste, encore aujourd'hui, la qualité la plus recherchée par les consommateurs. En effet, si les viandes bovines et porcines sont souvent considérées comme trop fermes, les viandes des autres espèces, poulet et poissons, sont surtout jugées pas assez ferme (Ouali *et al.*, 2006).

La viande dérive d'un muscle qui subit un grand nombre de changements biochimiques et physiologiques. Après l'abattage des animaux de boucherie, la tendreté va se mettre en place progressivement grâce au processus de maturation. Un processus multifactoriel très complexe essentiellement enzymatique, résultant de l'action de protéases endogènes sur les protéines myofibrillaires, fragilisant ainsi la structure musculaire (Kemp et Parr, 2012 ; Huang *et al.*, 2016).

En effet, selon son degré, la protéolyse conditionne le niveau de tendreté ou de fermeté de la viande. Cependant, dans le muscle *post-mortem*, le contrôle dynamique de ces enzymes sera modulé par :

1. Les changements des conditions physico-chimiques de la cellule et de son milieu comme par exemple le pH (Boudjellal *et al.*, 2008 ; Carlson *et al.*, 2017) ;
2. Les inhibiteurs présents au sein de la cellule, tels que les inhibiteurs de protéases à sérine ou serpins qui constituent, les meilleurs marqueurs biologiques de la tendreté (Zamora *et al.*, 1996 ; Zamora, 1997 ; Ouali, 1999 ; Zamora *et al.*, 2005).

Les serpins sont d'ailleurs intégrées dans des modèles de prédiction de la tendreté de la viande. Le seul groupe de peptidases fortement inhibées par ces serpins, se sont avérées être les caspases, famille très particulière de cystéines protéases qui jouent un rôle prépondérant dans le processus de mort cellulaire programmée par apoptose (Herrera-Mendez *et al.*, 2009). Ce processus apoptotique se met en place dans le tissu musculaire dès la mort de l'animal (Ouali *et al.*, 2006). Cette étape préliminaire pourrait avoir une importance cruciale dans le muscle *post-mortem* puisque tous les changements suivants qui contribuent à la conversion du muscle en viande en dépendront fortement.

Des études de différentes caractéristiques morphologiques ou biologiques de l'apoptose aboutissent à des conclusions qui confortent la théorie de la mise en place de l'apoptose dans le muscle *post-mortem* (Becila *et al.*, 2010 ; Cao *et al.*, 2013 ; Rodríguez-Frómata *et al.*, 2013 ; Ouali *et al.*, 2013 ; Zhang *et al.*, 2013 ; Sierra et Olivan, 2013 ; Longo *et al.*, 2015 ; Huang *et al.*, 2016 ; Wang *et al.*, 2017).

Ces auteurs ont mis en évidence l'apoptose dans le muscle *post mortem* par différentes caractéristiques telles que le rétrécissement des cellules, les modifications mitochondriales par libération du cytochrome c et le changement du potentiel membranaire ($\Delta\Psi_m$), la dégradation de l'ADN nucléaire en fragments réguliers, le changement de localisation des molécules de phosphatidylsérines d'une orientation cytoplasmique à une orientation extracellulaire et la dégradation de l'actine par les protéases apoptogènes (caspases). Les fragments d'actine générés ont été proposés comme des marqueurs potentiels d'apoptose (Yang *et al.*, 1998).

Ainsi sont justifiés les objectifs que nous nous sommes fixés en rapport avec la mise en évidence de l'ubiquité du phénomène de l'apoptose chez différentes espèces bouchères (volaille, caprin, bovin, ovin, camelin) et chez le poisson d'eau douce, après avoir choisi trois marqueurs de l'apoptose :

- L'externalisation des groupements phosphatidylserine ;
- L'hydrolyse de l'actine, première protéine cible des caspases ;
- Le relarguage mitochondriale du cytochrome c.

Les serpins étant reconnues pour être de bons marqueurs de la tendreté des viandes, nous avons jugé utile de compléter notre travail par un état de l'art sur ces serpins dans le muscle bovin susceptible de permettre à l'équipe MAQUAV de dégager des perspectives pertinentes dans la prédiction de la qualité des viandes.

Etude bibliographique

PRÉAMBULE

La synthèse bibliographique de cette thèse a pour but de présenter l'état de l'art de la transformation du muscle en viande, ainsi que les principaux facteurs biologiques responsables de la variabilité de sa tendreté.

Une partie de cette synthèse est consacrée aux marqueurs biologiques de la tendreté de la viande incluant les mécanismes biochimiques impliqués dans la transformation du muscle en viande et les marqueurs protéiques de la qualité de la viande. Ensuite, l'apoptose (la mort cellulaire programmée), première phase de transformation du muscle en viande après la saignée de l'animal est également abordée dans ce document. Enfin nous terminons par un chapitre qui traitera les serpins et les mécanismes d'inhibition des protéases cibles.

CHAPITRE I : MARQUEURS BIOLOGIQUES DE LA TENDRETE DE LA VIANDE

I.1- Transformation du muscle en viande

Le muscle constitue la chair des animaux, il est transformé en viande lors de la maturation. La transformation du muscle en viande commence dès la mort de l'animal. Cette étape de transformation fait appel à un ensemble de processus biochimiques très complexe impliquant des systèmes protéolytiques endogènes (Huang *et al.*, 2016).

La transformation *post-mortem* du muscle en viande se produit dès la saignée et se déroule en trois phases (**FIGURE 01**) et qui sont : la phase de mort cellulaire programmée (MCP) ou apoptose, la phase d'installation de la rigidité cadavérique ou *rigor mortis* et enfin la phase de maturation (Ouali *et al.*, 2006).

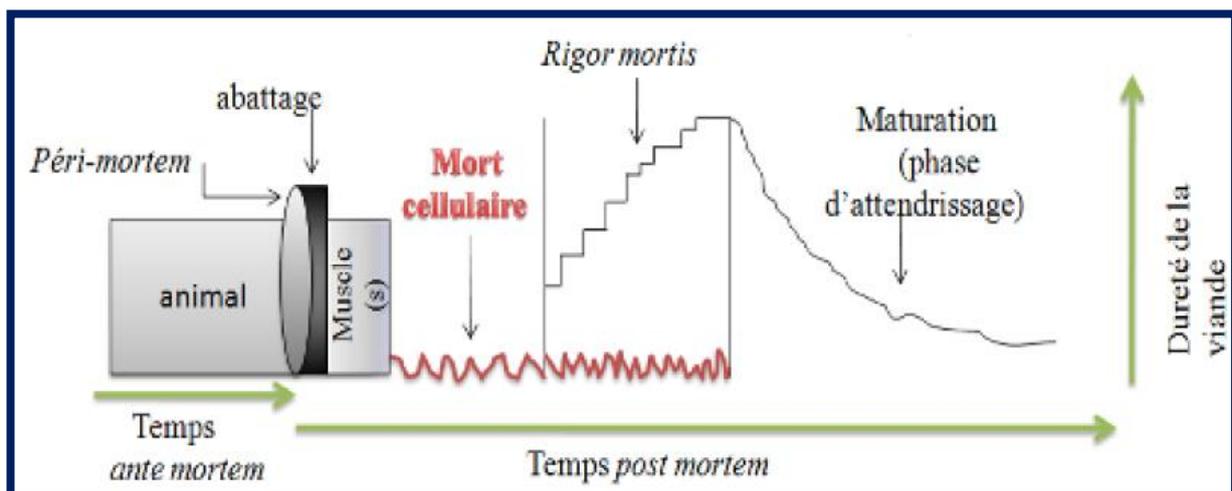


FIGURE 01 : Etapes de transformation du muscle en viande (Ouali *et al.*, 2006)

I.1.1- Phase de mort cellulaire programmée (MCP)

L'hypothèse de l'implication de la MCP dans les modifications *postmortem* du muscle en viande a été proposée pour la première fois par Ouali *et al.* (2006a). Elle a été émise à partir d'un constat simple : lors de l'abattage de l'animal, l'exsanguination de la carcasse prive les cellules de nutriments et d'oxygène. Le stress engendré va déclencher ainsi la mort cellulaire, les cellules s'engagent alors dans une voie de mort programmée. L'apoptose est caractérisée par l'activation d'une famille de protéases à cystéine, les caspases (pour **c**ysteine **a**spartyl **p**rotease). Les caspases vont alors initier la dégradation des structures cellulaires. Les caspases pourraient donc dégrader des protéines clés dans

l'organisation structurale des myofibrilles (Nakanishi *et al.*, 2001 ; Chen *et al.*, 2003), conjointement avec d'autres protéases, et donc ainsi jouer un rôle de premier plan dans la mise en place précoce de la tendreté, avant les calpaïnes. Leurs substrats dans la cellule seraient nombreux, ce qui est comparable à ce qui a été rapporté pour les calpaïnes. L'apoptose serait donc un processus précoce intervenant dans la mise en place de la tendreté (Ouali *et al.*, 2006).

I.1.2- Phase d'installation de la rigidité cadavérique

Cette phase est décomposée en deux étapes (Ouali, 1990). La première, dite période de latence, ou état pantelant. La deuxième est la période d'installation de la rigidité proprement dite.

a- Etat pantelant

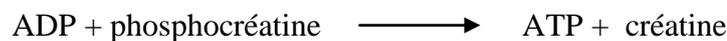
Pendant cette période, le muscle conserve encore une activité métabolique mais en puisant dans ses réserves énergétiques (Monin, 1988). Des contractions musculaires ont lieu, selon des impulsions nerveuses incontrôlées. Ce phénomène dure aussi longtemps que le système nerveux est encore actif (Maltin *et al.*, 2003). Sa durée est variable selon l'espèce considérée et les réserves énergétiques du muscle.

b- Installation de la rigidité cadavérique

Avec la fin de la phase dite « pantelante » la rigidité cadavérique s'installe progressivement. Elle se caractérise par des tissus musculaires plus durs, inextensibles et des axes osseux plus difficiles à déplacer chez l'animal.

Dans le tissu musculaire, après abattage, l'arrêt de la circulation sanguine stoppe l'apport en oxygène et en nutriments. Les cellules musculaires maintiennent leur homéostasie et elles ont donc besoin de régénérer les molécules d'ATP (Maltin *et al.* 2003).

En effet, la phosphocréatine est la première source de régénération de l'ATP utilisée par le muscle. Elle est présente en moindre quantité, de l'ordre de quelques µg/g de muscle à la fin de la saignée. Le taux d'ATP reste constant tant que la phosphocréatine est en quantité suffisante. La réaction de régénération de l'ATP à partir de la phosphocréatine est la suivante :



Rapidement, la phosphocréatine s'épuise et le taux d'ATP diminue. La synthèse d'ATP par la myokinase intervient alors. Cette enzyme, spécifique du muscle, permet de produire une molécule d'ATP à partir de deux molécules d'ADP :



Après, le métabolisme de régénération de l'ATP s'oriente vers la glycolyse anaérobie (dont le principal substrat énergétique est le glycogène). Le glycogène subit la glycogénolyse avec finalement production d'acide lactique et de protons ; la réaction peut être ainsi schématisée :



Cette voie métabolique induit la production de lactate et son accumulation. Chaque molécule d'acide lactique produite est associée à la libération d'un proton engendrant la diminution du pH. Cette diminution du pH inactive les enzymes et conduit à l'arrêt de la glycolyse et à l'épuisement des réserves d'ATP du muscle.

Cet épuisement définit l'étape de *rigor mortis* où le muscle ne peut plus se relaxer (Ouali, 1976 ; Got, 1997 ; Mathoniere, 1999). Cependant, comme cet épuisement n'a pas eu lieu simultanément dans toutes les fibres, l'état de *rigor* ne s'installe pas partout au même moment provoquant ainsi des contractions au sein du muscle. La rigidité apparaît quant à elle progressivement (Jeacocke, 1984). Elle devient maximale lorsque le pH atteint le pH ultime variant entre 5,3 et 6,0 selon l'espèce et le muscle

La durée de la *rigor mortis* est très variable en fonction du type de muscle et de l'espèce animal, allant de quelques heures (6-10h voire moins) chez le porc à 24h ou plus chez le bovin (Ouali, 1990a).

La diminution du pH observée inhibe les ATPases sarcoplasmiques, des pompes à calcium maintenant le gradient de calcium, provoquant une fuite de calcium du réticulum vers le cytosol. Quand la concentration de Ca^{2+} atteint 10^{-6} M, l'activité ATPasique de la myosine commence : formation du complexe actine-myosine.

I.1.3- Phase de la maturation

C'est durant cette phase que la viande commence à s'attendrir. C'est l'étape la plus importante car elle conduit à une augmentation de la tendreté de la viande. Ce processus de

maturation est principalement le résultat de mécanismes enzymatiques qui conduisent à la dégradation partielle (protéolyse ménagée) des constituants myofibrillaires et donc à leur fragilisation structurale. Plusieurs systèmes enzymatiques semblent être impliqués, au niveau du tissu musculaire, et agissent conjointement sur la maturation. Parmi les différents systèmes évoqués figurent les cathepsines lysosomales, le couple calpaïnes/calpastatine, système certainement le plus étudié, les protéases à sérine, les matrixines, le protéasome, et les caspases, dont l'implication dans le processus de maturation *post-mortem* du muscle en viande a été mise en évidence par Ouali *et al.* (2006). L'activité de ces systèmes enzymatiques dépend de la température, ainsi que de la vitesse et de l'amplitude de la chute du pH.

I.2- Evolution du pH *post-mortem*

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 modification du pH. La vitesse et l'ampleur de la chute de pH dans le muscle *post-mortem* sont des facteurs importants qui influent sur la qualité de la viande (Kwasiborski, 2008). En effet, l'acidification du muscle *post-mortem* va avoir une influence sur de nombreux processus cellulaires comme la migration des ions, l'osmolarité, la perméabilité des membranes, les mécanismes enzymatiques, la contraction musculaire (Zamora *et al.*, 2005) et la capacité de rétention d'eau (Offer, 1991).

La vitesse de diminution du pH *post-mortem*, est influencée par de nombreux facteurs comme l'espèce étudiée, la composition en fibres du muscle et l'état de stress de l'animal juste avant l'abattage. La vitesse de diminution du pH est déterminée principalement par l'activité ATPasique (Kwasiborski, 2008). Tous les facteurs modifiant cette activité entraînent un changement de la vitesse de diminution du pH (Bendall, 1973). Dans de bonnes conditions d'abattage, le pH diminue progressivement pour se stabiliser à une valeur appelée pH ultime (pHu). 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).

L'amplitude de la diminution du pH *post mortem* détermine la valeur du pHu. Elle dépend pour une grande partie des réserves en glycogène du muscle, plus celles-ci

sont importantes, plus la valeur du pHu sera faible (. La glycolyse dans le muscle *post mortem* cesse (Monin, 2003) :

- Soit par la 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 avec parfois la présence d'une quantité importante de glycogène résiduel ;
- 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) ;
- Soit par inactivation des enzymes de la glycolyse et de la glycolyse sous l'effet de la diminution du pH.

De nombreuses études ont mis en évidence un effet du pHu sur la tendreté de la viande. Des relations linéaires positives entre pHu et tendreté, estimée par mesure mécanique ou par analyse sensorielle, ont été rapportées pour la viande bovine (Bouton *et al.*, 1973; 1982) et de veau (Guignot, 1992). D'autres travaux ont révélé l'existence d'une relation curvilinéaire (Purchas, 1990 ; Holdstock *et al.*, 2014 ; Wu *et al.*, 2014). De telles relations ont été obtenues lorsque le pHu présentait une large amplitude de variation (5,4 à 7,0). Une valeur minimale de la tendreté a été enregistrée pour des valeurs de pH variant de 5,7 à 6,0.

L'augmentation de la tendreté enregistrée lorsque le pH ultime augmente au-delà de pH 6,0, a été attribuée à une amélioration conjointe de la capacité de rétention d'eau de la viande (Purchas, 1990). La relation curvilinéaire entre le pH ultime et la tendreté pourrait également refléter des différences dans l'intensité de la protéolyse au cours de la maturation (Boudjellal *et al.*, 2007).

I.3- Marqueurs biologiques de la tendreté de la viande

Les marqueurs biologique ou biomarqueurs de la qualité de la viande sont des indicateurs des processus biologiques mesurables quantitativement, une fois validés peuvent jouer un rôle essentiel dans (Picard *et al.*, 2014) :

- La compréhension de la transformation du muscle en viande ;

- La prédiction de l'évolution de la mise en place de la qualité de la viande et la classification des carcasses de viande ;
- Les programmes de sélection génétique.

Selon Berri *et al* (2016), disposer d'indicateurs fiables pour prédire la qualité des viandes est un enjeu majeur. Ces indicateurs faciliteraient la sélection d'animaux aptes à produire des viandes de bonnes qualités. De plus, ils permettraient l'amélioration des pratiques d'élevage et d'abattage susceptibles d'optimiser les capacités intrinsèques des tissus musculaires favorables à la qualité des viandes.

En effet deux types de marqueurs biologiques peuvent être distingués : les marqueurs génétiques et les marqueurs protéiques. Dans ce chapitre nous allons présenter une synthèse sur les biomarqueurs protéiques de la tendreté de la viande.

I.3.1- Rappel sur les événements majeurs survenant après la saigné de l'animal

Après la saignée des animaux, les tissus entrent dans un état d'anoxie ischémique qui affectera toutes les voies métaboliques et conduira à une adaptation de la plupart, voire de la totalité, des processus métaboliques (Ouali *et al.*, 2006, 2007).

Après privation de l'oxygène et l'entrée des cellules en anoxie, le premier objectif de la cellule musculaire sera d'améliorer ses capacités à fournir de l'énergie nécessaire pour des activités métaboliques accrues. Ceci a été prouvé par l'analyse quantitative des spots de gels d'électrophorèse bidimensionnelle (gels 2D) qui a démontré une augmentation des enzymes associées à la glycolyse et au cycle de l'acide tricarboxylique (TCA). Une conséquence majeure de cette intense activité métabolique sera l'accumulation de métabolites nocifs, comme le CO₂, HCO₃⁻, NH₄ et acide lactique, qui sont normalement transportés vers le foie où ils peuvent être recyclés (Ouali *et al.*, 2013). Une autre conséquence de l'anoxie sera la préservation des fonctions cellulaires par une augmentation de la concentration de plusieurs protéines de choc thermique ou protéines de stress (Heat Shock Protein : HSP), y compris les HSP 70, 40, 27, 20, αβ-crystallin.

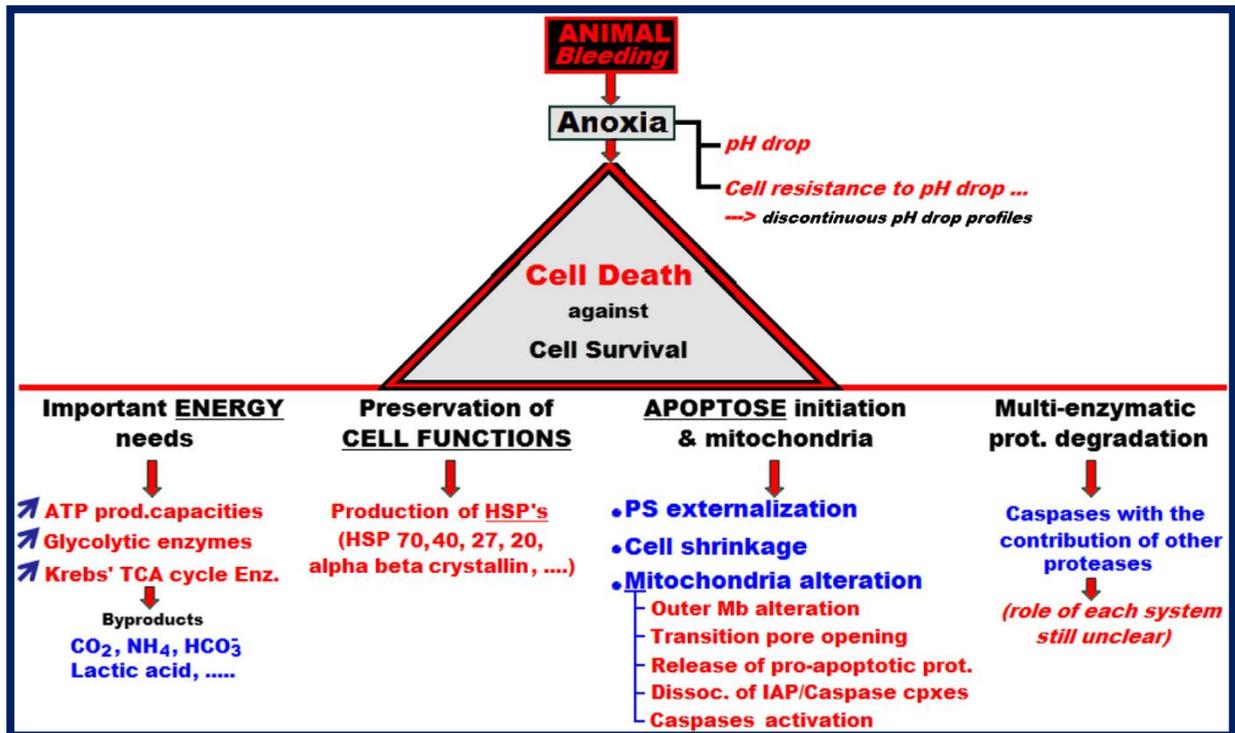


FIGURE 02 : Evénements majeurs survenant dans le muscle *post mortem* après arrêt de la circulation sanguine. Abbreviations: **TCA:** Tricarboxylic acids; **HSP,** Heat Shock Proteins; **PS:** Phosphatidylserine, **IAP:** Inhibitors of Apoptosis Proteins

En d'autres termes, la cellule développera des outils contradictoires pour la mort cellulaire ou les voies de survie de la cellule (**FIGURE 02**). La bataille entre la mort cellulaire et la survie cellulaire se révélera finalement au profit du processus de mort cellulaire par apoptose avec les changements caractéristiques bien connus associés à ce statut, en particulier le rétrécissement cellulaire et l'externalisation de la phosphatidylsérine, ainsi que l'altération des mitochondries (Ouali *et al.*, 2007 ; Becila *et al.*, 2010 ; D'Alessandro & Zolla, 2013). Un ensemble de protéines pro- et anti-apoptotiques sera libéré des mitochondries et leur rapport définira la vitesse et l'étendue du développement de l'apoptose.

Au final, Toutes ces protéines peuvent être prises en considération comme biomarqueurs de la tendreté de la viande.

I.3.2- Biomarqueurs potentiels de la tendreté de la viande

Pendant plusieurs décennies, les scientifiques de la viande recherchent en particuliers des marqueurs biologiques de la tendreté de la viande qui rendraient possible :

(1) la classification des coupes de viande juste après abattage sur la base de leur potentiel de tendreté finale (2) l'optimisation du choix génétique des animaux de viande sur la base de cette qualité. Malheureusement, de pareils marqueurs n'ont toujours pas pu être identifiés probablement en raison d'une connaissance un peu trop limitée des mécanismes biologiques responsables de l'amélioration *post mortem* de la texture de la viande.

Selon Ouali *et al.* (2013), une vue d'ensemble de la littérature a permis d'identifier une série de marqueurs potentiels de tendreté de la viande. Cette liste est loin d'être exhaustive et de nombreuses autres protéines restent à considérer. Un tel criblage a permis l'identification de 8 sous-groupes, les trois plus importants étant les voies énergétiques glycolytique et oxydante ainsi que les protéines de choc thermique (HSPs).

I.3.2.1- Marqueurs de la voie métabolique énergétique glytolytique

Tous les membres de ce groupe sont des enzymes de la voie glytolytique (**Tableau 1**). La glycolyse est un processus biphasé. La première phase consommant 2ATP, qui correspond à la conversion du glucose-1-phosphate, produit du glucose libre ou du glycogène par la phosphorylase, en deux trioses phosphate. Le second assure la conversion de 2 trioses phosphate (à partir d'un glucose) en pyruvate et ensuite en lactate, produisant 2 ATP et 1 NADH, H⁺. Deux enzymes, sur 5, de cette première phase ont été identifiées en tant que marqueurs potentiels de tendreté. Ce sont la première et la dernière de cette phase, c'est -à-dire la phosphoglucomutase (Bjarnadottir *et al.*, 2010; Chaze *et al.*, 2013) et et la Triosephosphate isomérase (Kim *et al.*, 2008). Dans les cellules musculaires, la triose prédominante est le dihydroxyacétone phosphate (DHAP), un métabolite important à un carrefour entre plusieurs voies métaboliques.

Sans compter que la continuité normale de la voie glytolytique à travers l'isomérisation en glyceraldehyde-3-P (deuxième phase de glycolyse), le DHAP peut également entrer dans la navette de glycérol-phosphate jouant un rôle important dans le muscle squelettique (Kalapos *et al.*, 1999).

Contrairement à la première phase, une majorité des enzymes impliquées dans a deuxième phase de la glycolyse (5 sur 6) ont été identifiés comme de bons marqueurs de tendreté. Il s'agit de la glyceraldehyde-3-phosphate hydratase déshydrogénase (GAPDH), la phosphoglycérate kinase (Jia *et al.*, 2006), la phosphopyruvate enolase (Choi *et al.*, 2010 ; La ville *et al.*, 2009), la pyruvate kinase (Laville *et al.*, 2009 ; Polati *et al.*, 2012) et

la lactate déshydrogénase (Choi *et al.*, 2010 ; Laville *et al.*, 2009 ; Polati *et al.*, 2012). Une caractéristique étonnante de cette deuxième phase est le rôle multifonctionnel de la GAPDH qui est présente dans différents compartiments de la cellule et peut contribuer à diverses fonctions cellulaires. Elle pourrait avoir ainsi une fonction pro-apoptotique (Tarze *et al.*, 2007) ou une fonction pro-survie (Colell *et al.*, 2007).

Tableau 1 : Marqueurs potentiels de tendreté appartenant à la voie glycolytique (Ouali *et al.*, 2013)

Marqueur	Localisation	Fonctions	*[M]	*Tend	Références
Phosphoglucomutase	Cytoplasme	Gluc-1P <=> Gluc 6P	+	+	Bjarnadottir <i>et al.</i> (2010); Bouley <i>et al.</i> (2004); Laville <i>et al.</i> (2009)
Triosephosphate isomerase	Cytoplasme	Dihydroxyacetone phosphate (DHAP) <=> glyceraldehyde 3-phosphate	+	+	Kim <i>et al.</i> (2009)
Glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (GAPDH)	Cytoplasme Noyau	glycéraldéhyde.3.phosphate <=> 1,3.diphosphoglycerase Mort et survie cellulaire	+	+	Colell, Green, and Ricci (2009); Laville <i>et al.</i> (2009)
3-Phosphoglycerate kinase	Cytoplasme	3-Phosphoglycerate + ADP <=> 1,3-bisphosphoglycerate +ADP	+	+	Jia, Hildrum, <i>et al.</i> (2006)
Aldehyde dehydrogenase (ALDH)	Cytosol et organelles	oxydation des Aldehydes en acides carboniques (glycolyse , dégradation des amino acides et des lipides)	+	+/-	Hollung <i>et al.</i> (2007); Jia, Hildrum, <i>et al.</i> (2006)
Enolase 3 ou phospho-pyruvate hydratase	Cytoplasme et muscle spécifique	2-Phosphoglycerate <=> phosphoenolpyruvate	+	+	Choi <i>et al.</i> (2010); Laville <i>et al.</i> (2009)
Pyruvate kinase	Cytoplasme	Phosphoenolpyruvate <=> pyruvate	+	+	Laville <i>et al.</i> (2009); Polati <i>et al.</i> (2012)
Lactate dehydrogenase	Cytoplasme	Pyruvate <=> lactate	+	+	Laville <i>et al.</i> (2009); Polati <i>et al.</i> (2012)

Abréviations: *[M], concentration du marqueur augmente (+) ou diminue (-); *Tend: Tendreté de la viande augmente (+) ou diminue (-) en fonction de la modification du niveau du marqueur. (+/-), Le changement induit par le marqueur vis à vis de la tendreté est variable, < => indique la réversibilité de la réaction.

L'aldéhyde déshydrogénase, un autre marqueur potentiel augmentant dans le muscle *post mortem*, contribue à la voie glycolytique à travers la conversion directe de la glycéraldéhyde en 2-phosphoglycerate (Jia *et al.*, 2006). Cette enzyme est un membre de la famille des aldéhydes déshydrogénases, qui est connue pour être impliquée dans de multiples autres processus comprenant le métabolisme des acides aminés et des acides gras (Vasiliou *et al.*, 2004). Quelques membres de cette famille d'aldéhyde oxydases protègent

contre des aldéhydes produits par peroxydation de lipides et la cytotoxicité globale d'aldéhyde et contre les stress oxydatif et osmotique (Brocker *et al.*, 2011 ; Brocker *et al.*, 2010 ; Pappa *et al.*, 2005).

I.3.2.2- Marqueurs de la voie métabolique énergétique oxydative

Schématiquement, le métabolisme énergétique oxydatif se termine à l'intérieur de la matrice mitochondriale où sont oxydés les produits finaux de la dégradation des lipides, des acides aminés et des polysaccharides pour fournir des substrats à la chaîne de transport d'électrons et à l'ATP synthase responsable de la production d'ATP. Cette voie emploie tous les produits finaux fournis par la dégradation des sucres, particulièrement le glucose (glycolyse), les protéines (et plus exactement les acides aminés provenant d'acides aminés libres ou de l'hydrolyse de protéines) et des acides gras produits à partir de triglycérides. Sept marqueurs de tendreté venant de ces voies énergétiques ont été jusqu'ici identifiées (**voir Tableau 2**) :

- La 3-Hydroxyisobutyrate déshydrogénase est une enzyme impliquée dans la dégradation de la valine ramifiée en succinyl-CoA, un intermédiaire du cycle des acides tricarboxyliques (Lokanath *et al.*, 2005 ; Jia, *et al.*, 2007) ;

- La β -Hydroxyacyl CoA-déshydrogénase (HADH) est un intermédiaire de la β -oxydation (ou hélice de Lynen) des lipides qui produit l'acétyl-CoA, un métabolite entrant dans le cycle des acides tricarboxyliques (Hamill *et al.*, 2012 ; Polati *et al.*, 2012) ;

- Le cytochrome c est un membre de la chaîne de transport d'électron situé à l'extérieur de la membrane intérieure des mitochondries (Ding *et al.*, 2002) ;

- Les trois autres marqueurs identifiés de cette voie sont : la succinate déshydrogénase, la Succinyl Co-A synthase et l'Isocitrate déshydrogénase, et qui sont tous des membres du Cycle de Krebs (Hamill *et al.*, 2012 ; Kim *et al.*, 2009).

Tableau 2 : Marqueurs potentiels de tendreté appartenant à la voie aérobie (Ouali *et al.*, 2013)

Marqueur	Localisation	Fonctions	*[M]	*Tend	Références
3-Hydroxyisobutyrate dehydrogenase (1)	Mitochondrie	1 des 9 étapes de la dégradation de la valine en Succinyl-CoA	+	+	Jia, Hollung, <i>et al.</i> (2006); Jia <i>et al.</i> (2007)
β -Hydroxyacyl CoA-dehydrogenase	Matrice mitochondriale	Dégradation des acides gras (helice de Lynen)	+	+	Hamill <i>et al.</i> (2012); Polati <i>et al.</i> (2012)
Cytochrome c	Mitochondrie	Chaîne de transport d'électrons au niveau de la membrane mitochondriale. Apoptose	+	+	Ding <i>et al.</i> (2002)
Succinate dehydrogenase	Matrice mitochondriale	Cycle TriCarboxylique (TCA)	+	+	Kim <i>et al.</i> (2009)
Succinyl Co-A synthase	Matrice mitochondriale	Cycle TriCarboxylique (TCA)	+	+	Hollung <i>et al.</i> (2007); Jia, Hildrum, <i>et al.</i> (2006)
Isocitrate dehydrogenase	Matrice mitochondriale	Cycle TriCarboxylique (TCA)	+	+/-	Hamill <i>et al.</i> (2012); Zapata <i>et al.</i> (2009)
ATP synthase	Membrane mitochondriale interne	Synthèse de l'ATP	+	+	Hamill <i>et al.</i> (2012); Zapata <i>et al.</i> (2009)

Abréviations: *[M], concentration du marqueur augmente (+) ou diminue (-); *Tend: Tendreté de la viande augmentée (+) ou diminuée (-) en fonction de la modification du niveau du marqueur. (+/-), Le changement induit par le marqueur vis à vis de la tendreté est variable, <=> indique la réversibilité de la réaction.

I.3.2.3- Marqueurs impliqués dans la détoxification cellulaire

Dans les cellules vivantes, plusieurs déchets métaboliques sont produits par le métabolisme cellulaires. Certains d'entre eux sont normalement éliminés directement ou après transport sanguin vers le foie. Les plus importants sont :

- Le NH₄ produit pendant la dégradation d'acides aminés pour la production énergétique, et qui est recyclé, in vivo, durant le cycle d'urée dans le foie ;
- Le Methylglyoxal, un sous-produit de DHAP ;
- Le dioxyde de carbone (CO₂) libéré du cycle de Krebs lors de la conversion du glycérate en acétyl-CoA ;
- L'acide carbonique(H₂CO₃) formé à partir de la conversion de CO₂ par l'anhydrase carbonique ;
- Les aldéhydes toxiques.

Dans le muscle *post mortem*, certaines enzymes sont capables de métaboliser plus ou moins ces métabolites. L'anhydrase carbonique peut catalyser la conversion du CO₂ en

bicarbonate, ce qui pourrait expliquer, au moins en partie, la discontinuité observée dans les profils de pH (Boudjellal *et al.*, 2008).

La lactoylglutathione lyase, ou Glyoxylase 1, peut catalyser la première étape de la conversion du méthylglyoxal en lactate. Enfin, en plus de leur fonction dans la glycolyse (Jia, *et al.*, 2006), quelques membres de la famille des complexes aldéhyde déshydrogénases (Vasiliou *et al.*, 2012), ont pu également protéger des cellules contre des effets cytotoxiques de divers aldéhydes s'accumulant dans le cytosol (O'Brien *et al.*, 2005). Il est à noter que ces trois enzymes ont été identifiées comme potentiels marqueurs de tendreté (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Marqueurs potentiels de tendreté impliqués dans la détoxification cellulaire (Ouali *et al.*, 2013)

Marqueur	Localisation	Fonctions	*[M]	*Tend	Références
Anhydrase carbonique	Cytosol et Mitochondrie	Elimination CO ₂ ; H ₂ O + CO ₂ => HCO ₃ + H ⁺	+	+	D'Alessandro et Zolla (2013); Polati <i>et al.</i> (2012); Zapata <i>et al.</i> (2009)
Lactoylglutathione lyase ou Glyoxylase 1	Cytosol	Détoxification méthylglyoxal => lactate	+	+	Jia, Hildrum, <i>et al.</i> (2006)
Aldehyde déhydrogénases (ALDHs)	Cytosol et toutes les organelles	Protège les cellules des aldéhydes cytotoxiques	+	+/-	Hollung <i>et al.</i> (2007); Jia, Hildrum, <i>et al.</i> (2006)

Abréviations: *[M], concentration du marqueur augmente (+) ou diminue (-); *Tend: Tendreté de la viande augmentée (+) ou diminuée (-) en fonction de la modification du niveau du marqueur. (+/-), Le changement induit par le marqueur vis à vis de la tendreté est variable.

I.3.2.4- Marqueurs de la famille des protéines de choc thermique

Quelque soit sa nature, le stress induit la synthèse des protéines protectrices appelées protéines de choc thermique (HSP : Heat Shock Proteins en anglais) qui préservent les protéines cellulaires contre la dénaturation et la perte possible de la fonction (Kultz, 2003). Les protéines de choc thermiques connues sont généralement classées dans des sous-familles sur la base de leur poids moléculaire en kDa : HSP 90, HSP 70, HSP 40, HSP 27, etc. La plupart d'entre elles jouent un rôle important en tant que chaperonnes moléculaires lors de l'assemblage des protéines (Haslbeck *et al.*, 2005), le repliement et dépliement protéiques (Zietkiewicz *et al.*, 2004), et le repliement des protéines endommagées (Marques *et al.*, 2006).

Nous pouvons donc s'attendre à ce que les HSPs, appelé également les protéines du stress, auront au moment de la mort de l'animal, une fonction de pro-survie et, par conséquent, un rôle anti-apoptotique (Arrigo, 2005 ; Arrigo *et al.*, 2002 ; Beere, 2001, 2004, 2005). Les HSPs peuvent donc avoir des actions anti-apoptotiques diverses qui peuvent être résumées comme suit :

- Formation d'un complexe avec les caspases actives (initiatrices ou effectrices) entravant ainsi leur fonction ;
- Protection des protéines cibles des caspases effectrices, empêchant ou retardant leur dégradation par ces enzymes ;
- Restauration de la structure initiale et active des protéines ayant subis des dommages structuraux soit après le stress lui même ou l'initiation de l'apoptose.

Comme résumé dans le **Tableau 4**, un grand nombre de HSP ont été associés à la tendreté de la viande. Selon la plupart des études, l'augmentation des niveaux de HSP entraîne un durcissement de la viande. Cependant, il est difficile d'analyser globalement la contribution des HSP à l'attendrissage de la viande, et chacune d'entre elles doit être considérée séparément. De plus, le rôle des HSP dans le muscle *post mortem* n'est pas clair et des investigations supplémentaires sur les mécanismes sous-jacents seront nécessaires.

Tableau 4 : Les HSP comme marqueurs potentiels de tendreté (Ouali *et al.*, 2013)

Marqueur	Localisation	Fonctions	*[M]	*Tend	Références
HSP 70	cytoplasme	Ralentir le processus de mort cellulaire; Protection des tissus contre le stress oxydatif ; Dépôt de graisses	+	-	Cassar-Malek <i>et al.</i> (2011); Guillemin, <i>et al.</i> (2011)
HSP 40	Cytoplasme et noyau	Chaperone impliquée dans l'importation de protéines dans les mitochondries et un co-chaperone de HSP70	+	-	Bernard <i>et al.</i> (2007); Picard <i>et al.</i> (2010)
HSPB1 (HSP 27))	Surface cellulaire, cytoplasme et noyau	Réponse au stress et à la hausse de température ; Régulation, stabilisation des protéines myofibrillaires, et protection des filaments d'actine et desmin	+	-	Bernard <i>et al.</i> (2007); Guillemin <i>et al.</i> (2011); Morzel <i>et al.</i> (2008)
HSP 60	Surface cellulaire, cytoplasme	Prévient la dégradation des protéines du processus apoptotique au niveau des cellules musculaires	+	-	Beere (2005); Jia, Hollung, <i>et al.</i> (2006)

Abréviations: *[M], concentration du marqueur augmente (+) ou diminue (-); *Tend: Tendreté de la viande augmentée (+) ou diminuée (-) en fonction de la modification du niveau du marqueur. (+/-), Le changement induit par le marqueur vis à vis de la tendreté est variable.

I.3.2.5- Protéines anti-oxydantes comme marqueurs de la tendreté

Nous rapportons ici l'exemple et la Peroxiredoxin-6, un antioxydant contribuant à la dégradation du peroxyde d'hydrogène et présentant une activité phospholipase (Jia *et al.*, 2009).

La peroxiredoxine 6 (Prdx6) est le sixième (et final) Membre de la famille Prdx des mammifères. Elle possède des propriétés fonctionnelles importantes qui l'a rendent unique parmi les Prdxs. Jia *et al.*, (2009) ont rapporté une surexpression de Prdx6 dans la viande tendre, une constatation en contradiction avec les activités anti-apoptotiques et / ou de survie cellulaire de cette protéine. Cependant, il est actuellement difficile d'obtenir des conclusions sur les fonctions de Prdx6 dans le muscle post-mortem et donc des études plus détaillées seront nécessaires afin de clarifier la nature exacte de la relation entre les activités de la Prdx6 et la tendreté ultime de la viande.

I.3.2.6- Protéases et inhibiteurs de protéases comme marqueurs de la tendreté de la viande

Depuis des décennies, le processus d'attendrissage de la viande est unanimement reconnu comme étant enzymatique et les systèmes protéolytiques les plus étudiés sont les cathepsines, les calpains, le protéasome 20S et, plus récemment, les membres de la famille des caspases (Kemp & Parr, 2012; Sentandreu *et al.*, 2002). Cependant, les principales peptidases d'intérêt ne sont pas encore identifiées de façon certaine et cette question est encore fortement débattue.

En 1990, Ouali & Talmant ont prouvé que le rapport enzyme / inhibiteur après la saignée de l'animal ou les concentrations d'inhibiteur seules sont à la fois les meilleurs prédicteurs de la tendresse de la viande rapportés à ce jour.

Depuis lors, tous les essais visant à associer les concentrations enzymatiques à la tendreté de la viande ont échoué. Des essais avec la calpastatine, l'inhibiteur spécifique commun des calpains 1 et 2, n'ont pas été convaincants et ne sont pas reproductibles. Les cystatines, un groupe d'inhibiteurs de la cystéine protéase, ont été identifiées comme des marqueurs potentiels dans une seule étude réalisée par Shackelford *et al.*(1991). Ces auteurs ont donc souligné que les niveaux de cystatine au moment de l'abattage présentaient une corrélation beaucoup plus élevée avec la force de cisaillement de Warner-Bratzler à 7 jours *post-mortem* que les niveaux de calpastatine seuls ($r = +0,62$ vs $-0,23$

pour la calpastatine), une caractéristique confirmant le manque de fiabilité de calpastatine comme prédicteur de la tendreté de la viande comme suggéré auparavant par Ouali *et al.*(1990).

Plus tard, les taux d'inhibiteurs de sérine-protéase ont été montré pour être les meilleurs prédicteurs de la tendreté de la viande parmi une trentaine de variables quantitatives, y compris les calpaïnes et les calpastatines (Zamora *et al.*, 1996, 2005). Cette caractéristique inattendue a été extrêmement surprenante car aucune sérine-protéase susceptible de contribuer à la dégradation myofibrillaire n'a été rapporté (Gagaoua *et al.*, 2012; Ouali, 1990). Les recherches effectuées par la suite sur le muscle bovin visant à identifier ces inhibiteurs intracellulaires ont révélé que la plupart d'entre eux appartiennent à la superfamille des serpines (acronyme de SERine Proteases Inhibitors), la plus grande sous-famille d'inhibiteurs de la sérine-protéase. Les serpins sont des inhibiteurs pseudo-réversibles de serines protéases, de cystéines protéases et éventuellement d'autres groupes de protéases. Certains d'entre eux ne présentent aucune activité inhibitrice et remplissent d'autres fonctions (Olson & Gettins, 2011). Les serpines bovines englobent au moins 8 isoformes différentes (Pelissier *et al.*, 2008). La plupart d'entre eux (6 sur 8) inhibent fortement des caspases initiatrices et effectrices, qui sont très probablement leurs protéases cibles naturelles in situ (Herrera-Mendez *et al.*, 2009). Comme ils se lient étroitement aux caspases, ils doivent être considérés comme des inhibiteurs efficaces du processus apoptotique caspase dépendant qui semble être le cas dans le muscle *post-mortem* (Ouali *et al.*, 2013).

Nous présentons une synthèse bibliographique détaillée sur les serpines ainsi que leurs mode d'inhibition dans un chapitre à part.

I.3.3- Perspectives d'avenir dans la recherche des prédicteurs de la tendreté de la viande

L'électrophorèse bidimensionnelle en gel, couplée à l'analyse par spectrométrie de masse du protéome musculaire, fournit beaucoup d'informations sur les changements survenant au cours de la maturation de la viande. Si nous voulons progresser dans ce domaine, nous devons maintenant faire un pas en arrière avec le but de regarder et

synthétiquement analyser les ensembles de données disponibles afin de cibler les points clés dans les processus biochimiques mis en œuvre lors de la conversion des muscles en viande et donc clarifier les étapes majeures et limitantes des voies métaboliques préoccupantes (Ouali *et al.*, 2016).

CHAPITRE II : APOPTOSE ET SCIENCE DE LA VIANDE

II.1- Apoptose ou Mort Cellulaire Programmée (MCP)

L'apoptose est une Mort Cellulaire Programmée (MCP) faisant partie intégrante de la physiologie normale d'un organisme vivant. Elle permet d'éliminer les cellules en excès, endommagées ou potentiellement dangereuses pour l'organisme sans endommager les cellules voisines (Kerr *et al.*, 1972 ; Marchetti, 2005).

Le mot apoptose fait référence à la chute programmée des feuilles à l'automne : « *apo* » pour éloignement et « *ptose* » pour chute en grec ancien. Ce terme imagé a été introduit dans le vocabulaire biologique et médical par Kerr *et al.* (1972) pour désigner une forme de mort cellulaire totalement différente de la nécrose, tant d'un point de vue morphologique que biochimique.

L'apoptose est une réponse hautement conservée des organismes unicellulaires jusqu'aux mammifères. Ce mécanisme de suicide est fondamental pour le développement des organismes (Williams et Smith, 1993). Durant l'embryogenèse, de nombreuses structures initialement mises en place au cours du développement sont ensuite détruites par apoptose. C'est le cas du canal de Müller et du canal de Wolff lors de la différenciation sexuelle. L'apoptose participe également à la morphogenèse des mains et des pieds où les cellules de l'espace interdigital disparaissent par apoptose (Wood *et al.*, 2000).

La mise en place des systèmes nerveux et immunitaire fait également appel à l'apoptose pour qu'un nombre correct de cellules souches se différencient. Pendant le développement embryonnaire, les neurones sont générés en excès et les cellules excédentaires vont ensuite mourir par apoptose afin de créer un équilibre entre les neurones et les cibles qu'ils innervent (Clarke *et al.*, 1998).

Le but principal de l'existence de ce phénomène est de permettre l'élimination contrôlée des cellules indésirables pour l'organisme, soit parce qu'elles sont en excès, inutiles ou dysfonctionnelles (Kerr *et al.*, 1972 ; Fidzianska *et al.*, 1991 ; Meier *et al.*, 2000 ; Dirks et Leeuwenburgh, 2005).

La régulation très stricte de l'apoptose est essentielle pour s'assurer qu'elle est activée uniquement dans la cellule concernée et au bon moment. À l'inverse, la dérégulation du processus apoptotique conduit, chez l'homme, à diverses pathologies

comme, par exemple, le(s) cancer(s), les maladies auto-immunes et les maladies neurodégénératives (Ouali *et al.*, 2006a)

II.2- Apoptose et autres types de morts cellulaires

Selon Kroemer *et al.* (2009), la mort cellulaire peut être classée en fonction de :

- Son aspect morphologique qui peut être apoptotique, nécrotique, autophagique ou associé à la mitose ;
- Ses critères enzymologiques avec et sans la participation des nucléases ou des classes distinctes des protéases, telles que les caspases, calpaines, cathepsines et transglutaminases ;
- Ses aspects fonctionnels et immunologiques programmés ou accidentel, physiologique ou pathologique, immunogène ou non-immunogène.

D'après ces mêmes auteurs, trois principaux types de mort cellulaire sont reconnus : apoptose, nécrose et autophagie (**Figure 03**). L'autophagie est un processus quelque peu différent car il constitue un mécanisme de survie de la cellule à une carence en nutriments. L'auto-digestion de ses organites permet à la cellule de palier ses besoins en substrats (Hotchkiss, Strasser *et al.*, 2009). Lorsque la carence persiste, la cellule enclenche un processus de mort cellulaire « autophagy associated cell death ».

L'autophagie est un processus de dégradation qui fournit à la cellule un apport d'acides aminés ou d'acides gras essentiels à la synthèse protéique ou lipidique. Cependant, une autophagie dérégulée peut également conduire à la mort cellulaire probablement par autoconsommation excessive des constituants vitaux de la cellule. Nous parlons de mort cellulaire associée à l'autophagie plutôt que de mort par autophagie car malgré la présence de nombreuses vacuoles d'autophagie dans des cellules en cours de mort, l'implication directe de l'autophagie dans la mort cellulaire n'est pas clairement établie. L'autophagie servirait de mécanisme de secours pour induire la mort si l'apoptose est déficiente (Levine et Yuan, 2005).

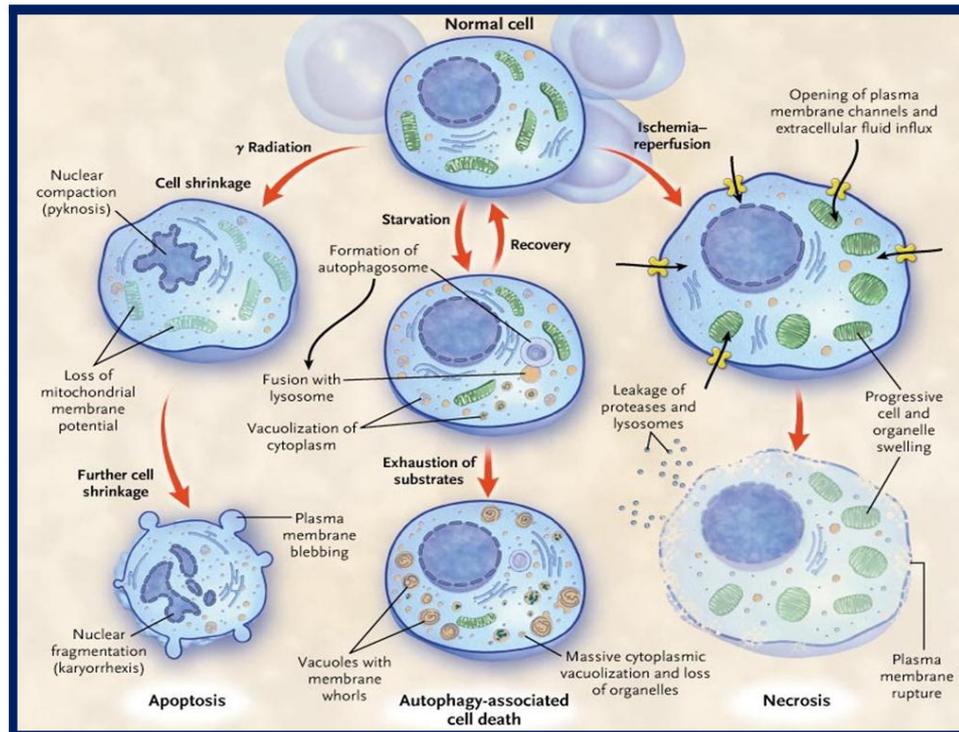


FIGURE 03: Les trois principaux types de mort cellulaire : apoptose, nécrose et autophagie (Hotchkiss *et al.*, 2009). Changements morphologiques induits par ces trois types de mort cellulaire suite à divers stimuli, comme par exemple l’irradiation pour l’apoptose, le manque de substrats pour l’autophagie et l’ischémie-reperfusion pour la nécrose. L’apoptose est caractérisée par le rétrécissement de la cellule et le maintien de l’intégrité de la membrane plasmique. La nécrose à l’inverse fait intervenir une perméabilisation précoce de la membrane plasmique qui provoque une lyse de la cellule.

L’apoptose et la nécrose ont longtemps été opposées. La nécrose est considérée comme une mort cellulaire accidentelle et désordonnée (**Figure 03**) en réponse à un traumatisme grave (exemple infection ou ischémie). Morphologiquement, les cellules nécrotiques se caractérisent par un gonflement des organites, comme le réticulum endoplasmique et la mitochondrie qui vont être par la suite rompues, ainsi que la membrane plasmique. L’ADN nucléaire est dégradé de manière aléatoire par des endonucléases activées notamment par des sérine peptidases. La taille des fragments d’ADN ainsi générés est très hétérogène. Etant donné que tout le contenu de la cellule, et en particulier les protéases, est relargué à l’extérieur, il y a une destruction du tissu cellulaire d’où une **réaction inflammatoire** avec des monocytes et lymphocytes. Ce qui n’est pas le cas pour les autres types de mort cellulaire (Hotchkiss, 2009 ; Ouali *et al.*, 2006 ; Marchetti, 2005).

II.3- Caractéristiques de l'apoptose

Selon Ouali *et al* (2006), l'apoptose est considérée comme une mort cellulaire "ordonnée", réalisée en plusieurs étapes et s'accompagnant de changements morphologiques caractéristiques. Dans un premier temps, les cellules en apoptose s'isolent des autres par perte des contacts intercellulaires. Ensuite une importante condensation à la fois du noyau et du cytoplasme induit une diminution significative du volume cellulaire (pyknosis). Après condensation du noyau, la chromatine est clivée en fragments réguliers d'environ 180 paires de bases (karyorrhexis). Parfois, la membrane plasmique bourgeonne et forme des corps apoptotiques renfermant une partie du cytoplasme de la cellule (blebbing). Afin de faciliter la reconnaissance des corps apoptotiques par les phagocytes, la cellule signale son état apoptotique à son environnement grâce au changement de localisation des molécules de phosphatidylsérines qui passent d'une orientation cytoplasmique à une orientation extracellulaire (Kroemer *et al.*, 2009).

Une autre caractéristique importante est que les mitochondries de la cellule apoptotique subissent plusieurs modifications majeures : libération du cytochrome c dans le cytoplasme, diminution du potentiel membranaire ($\Delta\Psi_m$) et altération de la perméabilité membranaire avec ouverture de pores spécialisés (Youle et Karbowski, 2005 ; Kroemer *et al.*, 2009).

En résumé, ces événements confèrent à la cellule apoptotique une morphologie distincte et caractéristique qui comprend la condensation de la chromatine, la fragmentation du noyau, formation des corps apoptotiques et organelles restées intactes.

II.4- Schéma général de l'apoptose

L'apoptose peut être déclenchée soit par des stimuli extrinsèques à travers des récepteurs de la mort de la surface cellulaire, tels que les récepteurs TNF α (facteur de nécrose tumorale- α), Fas (CD95 / APO1) et TRAIL (TNF liés à l'apoptose induite par le ligand) ou par des stimuli intrinsèques via la voie de signalisation mitochondriale (**FIGURE 3**). Dans les deux cas, l'activation des cystéines aspartyl protéases, appelées caspases, entraîne la perméabilisation de la membrane mitochondriale, la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN, entraînant ainsi la destruction de la cellule (GREEN, 2005).

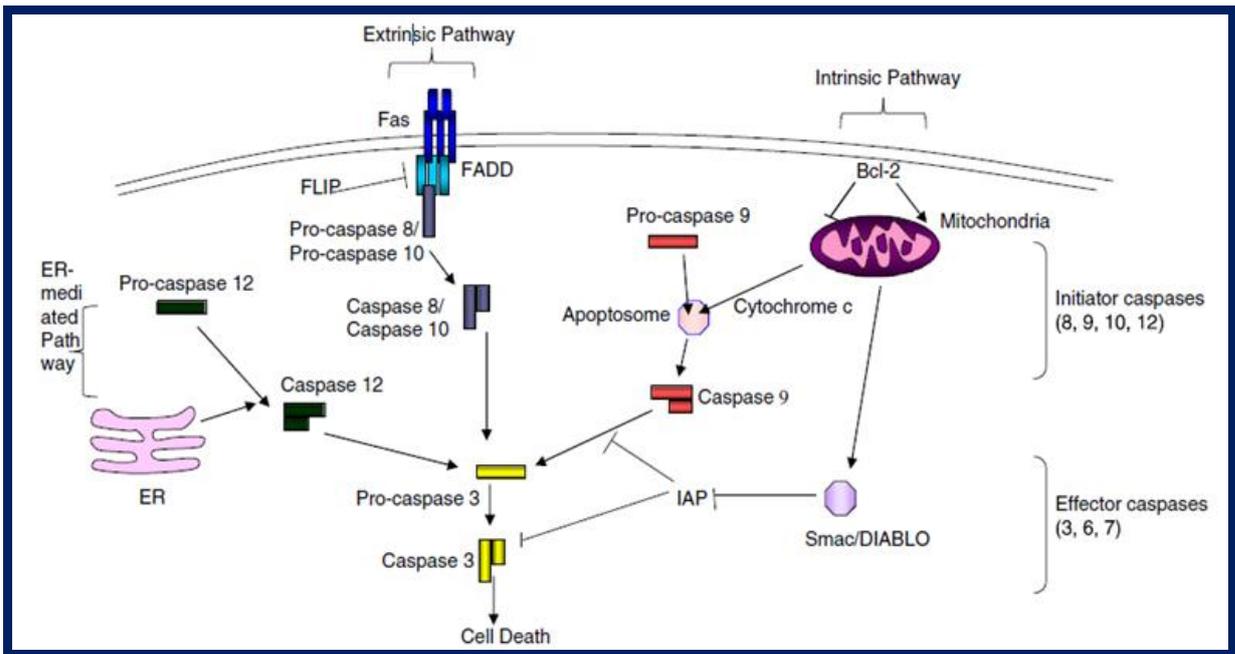


FIGURE 04 : Schéma général de l'apoptose avec les différentes voies (Kemp et Parr, 2012). **FADD**: Fas Associated Death domain, **IAP**: Inhibitor of Apoptosis, **Smac**: secondary mitochondrial activator of caspases, **DIABLO**: direct IAP-binding protein, **ARC**: apoptosis repressor with caspase recruitment domain

Les caspases (en anglais « cysteinyl-aspartate-cleaving proteases ») sont des protéases possédant un résidu cystéine dans leur site actif et un résidu aspartate dans leur site de clivage (Alnemri *et al.*, 1996). Il existe 14 caspases chez les mammifères dont 12 chez l'homme qui sont classées en trois sous-types : les caspases initiateuses et les caspases exécutrices ou effectrices apoptotiques ainsi que les caspases inflammatoires. Les caspases initiateuses sont en amont dans la cascade et, quand elles sont activées, elles activent à leur tour les caspases exécutrices. Ces caspases initiateuses sont capables de s'auto-activer en réponse aux stimuli pro-apoptotiques au sein de complexes multiprotéiques (Taylor *et al.*, 2008).

Toutes les caspases ont une structure très conservée et sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs ou zymogènes appelés pro-caspases (**FIGURE 05 A**). Les caspases sont formées de trois principales parties (Fuentes-Prior et Salvesen, 2004) :

- un pro-domaine N-terminal de taille variable ayant un rôle primordial dans les interactions protéine-protéine, en particulier avec les protéines régulatrices de l'apoptose ;
- Une grande sous-unité (*Large*) d'environ 20 kDa qui contient le site catalytique de l'enzyme et qui se situe au milieu de la molécule ;

- Enfin, une petite sous-unité (*Small*) d'environ 10 kDa localisée dans la partie carboxy-terminale et qui a un rôle conformationnel.

Le pro-domaine peut être constituée de deux motifs différents : le motif CARD (pour « caspase recruitment domain ») et DED (pour « death effector domain ») qui permettent une interaction entre les caspases (**Figure 4**). L'activation des pro-caspases nécessite le clivage du pro-domaine et un clivage entre la grande et la petite sous-unité. Ceci va permettre un réarrangement du site actif de la caspase en conformation active. Le site actif se trouve au niveau de la grande sous-unité mais celle-ci doit rester associée à la petite sous-unité pour exercer sa fonction catalytique (**Figure 5 A**). Les caspases fonctionnent classiquement en hétérotétramères suite à la dimérisation de deux hétérodimères. En l'absence de tout stimulus apoptotique, les caspases initiatrices existent sous forme de monomères et les caspases effectrices sous forme de dimères de pro-caspases (Taylor, Cullen *et al.*, 2008)

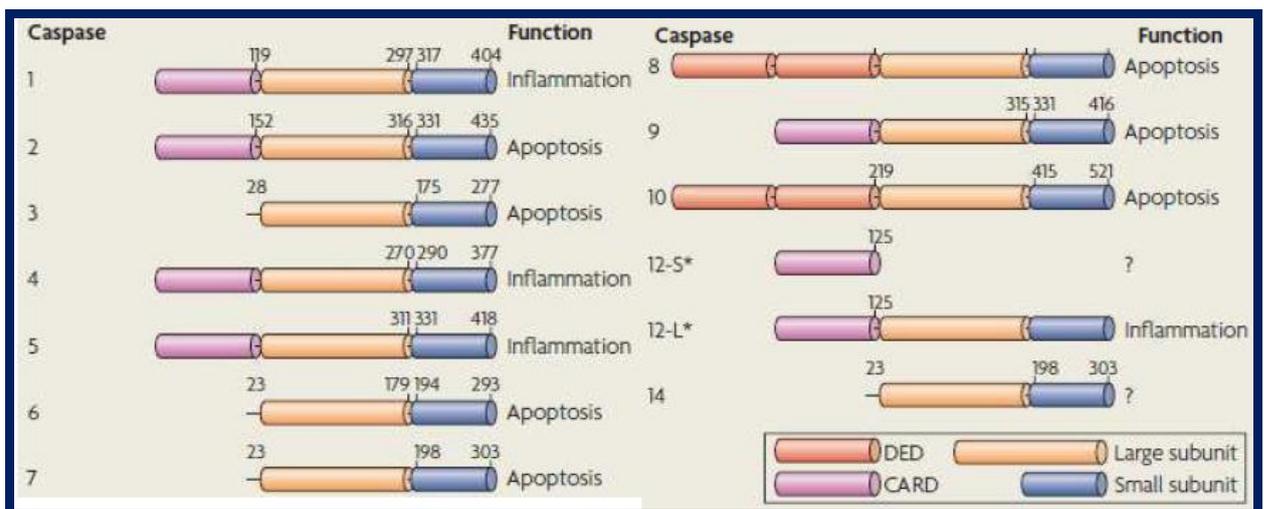


FIGURE 04*: Les caspases humaines (Taylor *et al.*, 2008). Sept caspases sont impliquées dans l'apoptose (caspases 2, 3, 6, 7, 8, 9 et 10) et quatre dans l'inflammation (caspases 1, 4, 5 et 12). La caspase 14 semble impliquée dans le développement des kératinocytes. La caspase 12 a une forme longue active (L) et une forme courte inactive (S).

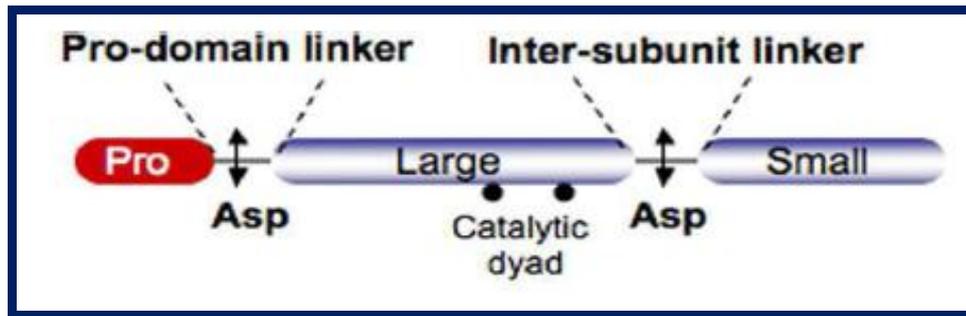


FIGURE 05A : Structure des caspases (Pop et Salvesen, 2009)

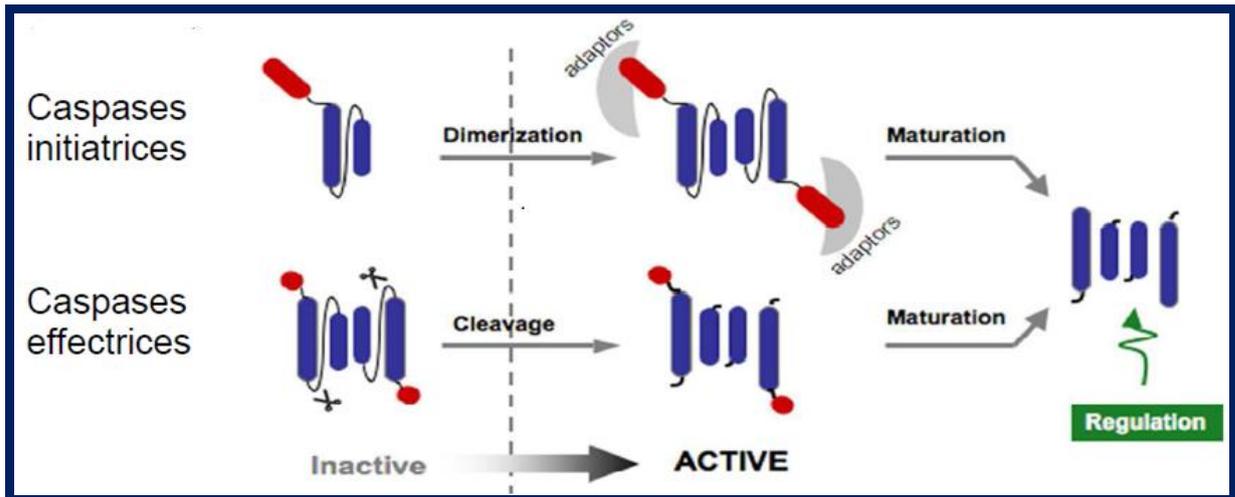


FIGURE 05B: Mode d'activation des caspases (Pop et Salvesen, 2009). Les pro-caspases initiatrices monomériques se dimérisent avant leur activation par clivage au niveau des résidus aspartate (Asp) présents entre le pro-domaine et la grande sous-unité et entre les deux sous-unités. Les pro-caspases effectrices dimériques sont activées par les mêmes clivages que les pro-caspases initiatrices. Les deux sous-unités restent associées.

Si les caspases initiatrices ont comme substrats les caspases exécutrices, les caspases exécutrices ont à leur tour des centaines de substrats qui vont contribuer à la destruction de la cellule apoptotique. La présence relativement fréquente des séquences peptidiques reconnues par les caspases dans les protéines humaines suggère l'existence d'une multitude de substrats pour ces protéases. A ce jour, plus de 800 substrats ont été identifiés et classés en fonction de leur importance dans la physiologie de la cellule (Fischer *et al.*, 2003)

II.4.1- La voie extrinsèque

Cette voie correspond à un stimulus impliquant les récepteurs de mort cellulaire qui sont capables de fixer des protéines inductrices ou inhibitrices du processus apoptotique de type cytokines. Ces récepteurs de mort appartiennent à la superfamille des récepteurs au *tumor necrosis factor* (TNFR) et incluent des récepteurs tels que le récepteur Fas, les

récepteurs au TNF (TNFR-1, TNFR-2) et les récepteurs au *TNF-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) DR-4 et DR-5 (Ashkenazi, 2002).

Dans le cas d'une protéine inductrice d'apoptose, sa fixation au récepteur va activer un complexe intracellulaire qui va pouvoir lier les peptidases initiatrices qui sont les caspases 8 et 10, par l'intermédiaire des domaines DED ou CARD. Cette étape est régulée par des protéines inhibant cette interaction et porteuses du même type de domaine. Un excès de ces protéines va détourner les caspases de leur complexe activateur cible. La caspase 8 active, prise en exemple ici, ainsi que la caspase 10 peuvent, à ce stade, être rendues inactives par fixation, au voisinage de leur site actif, de protéines inhibitrices d'apoptose ou IAP (*Inhibitors of Apoptose*). Dans le cas contraire, ces caspases vont être en mesure d'activer à leur tour les caspases exécutrices (caspases 3 et 7) responsables de la déstructuration de la cellule.

II.4.2- La voie intrinsèque

Cette voie correspond à des situations particulières où la cellule n'a pas d'autres solutions que le suicide. C'est donc elle-même qui va déclencher l'apoptose. En dehors de son rôle métabolique, il est apparu depuis une dizaine d'années que la mitochondrie joue un rôle clé dans l'apoptose (Green et Reed, 1998 ; Kroemer et Reed, 2000). De manière générale, la voie mitochondriale de l'apoptose est induite par des signaux de stress cellulaire tels que l'exposition à des radiations UV, une irradiation γ , des dommages à l'ADN, une déprivation en facteurs de survie ou encore suite à l'action d'oncoprotéines, de protéines suppresseur de tumeurs comme la protéine p53 ou de protéines de virulence virale. Enfin, la voie mitochondriale est activée par la plupart des agents chimiothérapeutiques (Kaufmann *et al.*, 2000 ; Kroemer, 2003).

Ce processus implique une détérioration des mitochondries par des protéines proapoptotiques de type *Bax*. Les mitochondries subissent une perte du potentiel membranaire ($\Delta\Psi_m$) et une perméabilisation de la membrane externe conduisant à la libération du cytochrome c (facteur proapoptotique) dans le cytosol. Cette altération est liée à la fixation d'un complexe protéique incluant *Bax* au niveau de la membrane mitochondriale. À noter que *Bcl2*, une protéine de la même famille que *Bax*, a quant à elle, une activité antiapoptotique et tendra à préserver la membrane mitochondriale. Le rapport de concentration de ces deux protéines antagonistes définira la vitesse avec laquelle le

cytochrome c sera libéré dans le cytosol. Le cytochrome c libre va alors former un complexe appelé apoptosome, impliquant, entre autre, une protéine désignée sous le nom de Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) et la caspase 9. L'apoptosome constitue le site d'activation de la caspase 9. Une fois activée, la caspase 9 pourra à son tour activer les caspases effectrices (caspases 3 et 7). L'activation de la cascade des caspases est quant à elle régulée par les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) qui se lient directement aux caspases et empêchent le clivage des caspases nécessaire à leur activation (Deveraux et Reed, 1999 ; Fesik et Shi, 2001).

Outre l'apoptose induite par l'action des caspases, les AIF (Apoptosis Inducing Factor) et l'endonucléase G de l'espace intermembranaire mitochondrial une fois libérés se déplacent vers le noyau et provoquent la fragmentation de l'ADN. La HSP70 prévient également leur déplacement (ADHIHETTY et HOOD, 2003). La perméabilisation du réticulum endoplasmique, à travers divers processus faisant intervenir des protéines proapoptotique Bcl-2, caspase 12 et le cytochrome c, provoque la libération du calcium qui se déplace vers les mitochondries induisant leurs entrées en apoptose comme illustré par Ouali *et al.*, 2013 (FIGURE 06).

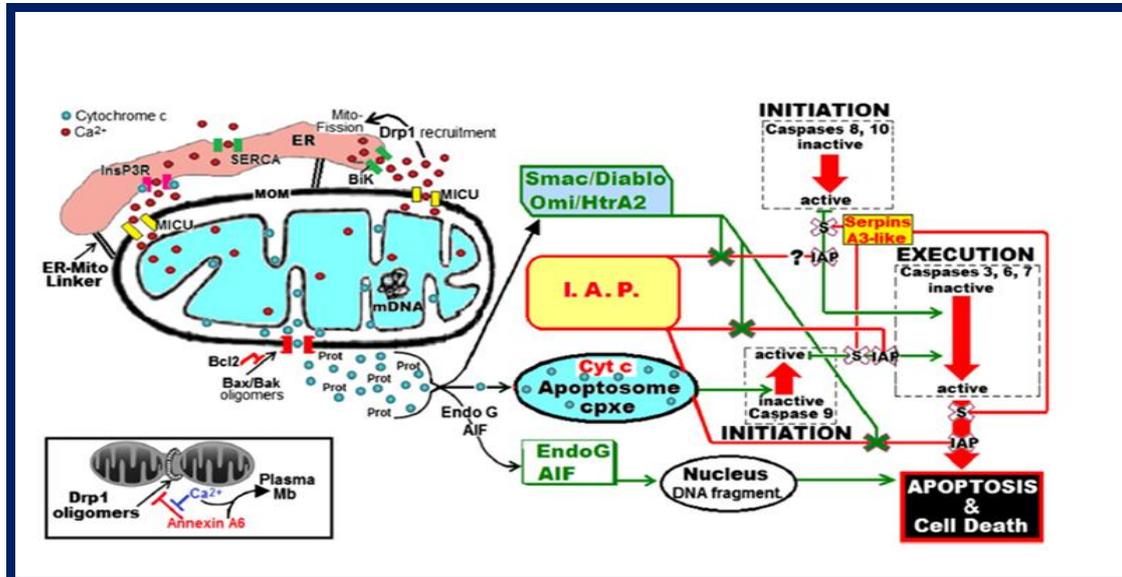


FIGURE 06 : Rôle des mitochondries dans l'apoptose (Ouali *et al.*, 2013)

II.5- Mise en place de l'apoptose dans le muscle *post-mortem* et ses conséquences

De nombreux auteurs ont indiqué que la nécrose n'a jamais été observée dans le muscle *post-mortem* (Becila *et al.*, 2010 ; Kemp et Parr, 2012 ; Cao *et al.*, 2013 ; Zhang *et al.*, 2013 ; Ouali *et al.*, 2013 ; Zhang *et al.*, 2013 ; Sierra et Olivan, 2013 ; Longo *et al.*,

2015 ; Huang *et al.*, 2016), le déclenchement de la mort cellulaire par le processus apoptotique serait alors l'issue la plus probable.

Sur les plans morphologiques et biochimiques, différentes caractéristiques révèlent le phénomène d'apoptose. Nous pouvons en citer 6 :

1. Le rétrécissement des cellules ;
2. Les modifications mitochondriales par libération du cytochrome c et par changement du potentiel membranaire au niveau de la mitochondrie ($\Delta\Psi_m$) ;
3. La dégradation de l'ADN nucléaire en fragments réguliers ;
4. Le changement de localisation des molécules de phosphatidylsérines (PS) d'une orientation cytoplasmique à une orientation extracellulaire ;
5. La dégradation étendue des protéines cytosquelettiques spécifiques, telle que l'actine, présumé être un marqueur potentiel du processus d'apoptose ;
6. L'activation de la cascade des caspases.

En premier lieu, une inversion de polarité est observée au niveau de la membrane cellulaire, provoquée par le changement d'orientation de certains constituants de la membrane plasmique, représentée par l'externalisation des phosphatidylsérines. En second lieu, on assiste à une dégradation caspasique de certains composants clés du cytosquelette, particulièrement les filaments d'actine.

De nombreux travaux ont tenté d'élucider les mécanismes impliqués dans les changements morphologiques dus à la mort cellulaire par apoptose dans le muscle *post-mortem* (Becila *et al.*, 2010 ; Cao *et al.*, 2013 ; Rodríguez- Frómeta *et al.*, 2013 ; Zhang *et al.*, 2013 ; Ouali *et al.*, 2013 ; Zhang *et al.*, 2013 ; Sierra et Olivan, 2013 ; Longo *et al.*, 2015 ; Huang *et al.*, 2016).

Deux constatations peuvent expliquer la théorie de l'apoptose dans le muscle *post mortem* :

1. Une inversion de polarité observée au niveau de la membrane cellulaire et provoquée par le changement d'orientation de certains constituants de la

membrane plasmique représentée par l'externalisation des phosphatidylsérines ;

2. Une dégradation caspasique de certains composants clés du cytosquelette particulièrement les filaments d'actine.

II.5.1- Dégradation de l'actine

L'actine est une protéine globulaire possédant un acide aminé rare, la 3-méthyl histidine, l'actine a un poids moléculaire de l'ordre de 43 kDa. C'est une chaîne polypeptidique très stable avec 376 résidus de séquence connue. Nous en connaissons deux formes: l'actine globulaire (Actine G) et l'actine filamenteuse (Actine F) dérivant de la première.

D'après Dingová *et al.* (2009) et Chhabra *et al.* (2009), l'Actine G peut se présenter sous forme de monomères dispersés qui peuvent s'assembler pour donner une forme filamenteuse (actine F). (Dans l'Actine F, les monomères(350 environ) placés bout à bout forment deux brins torsadés en hélice. Les myofilaments fins sont ainsi formés par l'association de cette double hélice et de deux protéines régulatrices (Poirier *et al.*, 1999).

Le processus apoptotique se compose d'une succession d'événements cellulaires dans un ordre bien déterminé avec une régulation très précise. Parmi ces événements, la dégradation de l'actine, une des protéines cytosquelettiques, a bénéficié d'un grand intérêt (Atencia *et al.*, 2000).

Il a été suggéré qu'une dégradation potentiellement mineure d'actine pourrait se produire dans le muscle *post-mortem* (Sancho *et al.*, 1997 ; Lametsch *et al.*, 2002 ; 2003 ; Morzel *et al.*, 2004 ; Rodríguez-Frómata *et al.*, 2013). La dégradation peut être mise en évidence par électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) à différents temps *post-mortem*, et les différents fragments peuvent être révélés par western blot par l'utilisation d'anticorps mono ou polyclonaux dirigés contre l'actine et ses fragments ou aussi par analyse protéomique couplée à la spectrométrie de masse.

De nombreux auteurs (Sancho *et al.*, 1997 ; Lametsch *et al.*, 2002 ; 2003 ; Morzel *et al.*, 2004 ; Rodríguez-Frómata *et al.*, 2013) ont avancé qu'une certaine dégradation

mineure d'actine pourrait survenir dans le muscle *post-mortem*. Cette dégradation est révélée par électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) à différents temps *post-mortem*. Les différents fragments peuvent être obtenus avec la technique Western Blot et le recours à des anticorps mono ou polyclonaux dirigés contre l'actine et ses fragments. L'analyse protéomique couplée à la spectrométrie de masse peut aussi être envisagée.

Les caspases dégradent les constituants cellulaires dont le cytosquelette. Ainsi, l'actine, la myosine, la spectrine, et la tubuline, entre autres, sont protéolysées. La structure de la cellule est affectée permettant son observation au microscope photonique. Les fragments d'actine obtenus sont proposés comme biomarqueurs potentiels de l'apoptose et de la tendreté de la viande (Yang *et al.*, 1998).

La dégradation précoce d'actine est associée à l'apoptose dans la mesure où elle est assurée par les caspases. Ainsi un fragment de 32 kDa a été identifié par Becila *et al.* (2010) confirmant ceux de nombreuses autres études et dans au moins trois circonstances différentes :

1. Dans des cellules apoptotiques en culture (Yang *et al.*, 1998) ;
2. Dans le muscle *post-mortem* (Lametsch *et al.*, 2002 ; 2003 ; Morzel *et al.*, 2004) ;
3. Sur l'actine pure hydrolysée par les caspases (Mashima *et al.*, 1995 ; Kayalar *et al.*, 1996).

II.5.2- Externalisation des phosphatidylsérines

Selon Bevers *et al.* (1996) et Krieser et White (2002), le phénomène d'apoptose peut être caractérisé comme suit :

1. La membrane plasmique forme des bourgeonnements à la surface des cellules ;
2. Les bourgeonnements se disloquent en fragments cellulaires entourés d'une membrane phospholipidique, les corps apoptotiques, contenant des parties du cytoplasme et du noyau ;

3. Les corps apoptotiques sont ensuite rapidement éliminés par les cellules du système immunitaire et éviter la libération du contenu cellulaire et une réponse inflammatoire locale ;
4. Translocalisation des phosphatidylsérines du feuillet interne de la membrane plasmique vers le feuillet externe.

Parmi les critères moléculaires permettant de distinguer la cellule apoptotique des autres cellules normales ou nécrotiques, il y a la membrane cellulaire, où une inversion de polarité est observée suite au changement d'orientation de certains constituants. Au cours de l'apoptose, la perméabilité membranaire est affectée et il est possible d'observer une asymétrie de la bicouche phospholipidique résultant de la translocation de la phosphatidylsérine de la membrane cellulaire interne vers l'extérieur.

Ainsi, la phosphatidylsérine est détectée à l'aide d'un marqueur spécifique, l'annexine V (Becila *et al.*, 2010). En présence de calcium, l'annexine V couplée à la fluorescéine, se lie avec une grande affinité à la phosphatidylsérine (Phospholipides majeurs de la membrane cellulaire). Ce marquage FITC-annexine V, avec une coloration d'exclusion au iodure de propidium suivi d'une cytométrie de flux permet de distinguer les cellules apoptotiques, des cellules normales ou nécrotiques (van Genderen *et al.*, 2008).

Les translocations font intervenir des translocases « scramblases », des « flippases » et des « floppases ». La phosphatidylcholine et de la phosphatidyléthanolamine bloquent temporairement le pH par effet tampon (Vance, 2008 repris par Gagaoua *et al.*, 2015). Ceci est une explication aux différents paliers de pH observés dans le muscle *Longissimus* de bovins Charolais et des muscles d'ovins ou de dromadaire, durant les dix heures qui suivent la mort de l'animal (Ouali *et al.*, 2006 ; Boudjellal *et al.*, 2008 ; Smili *et al.*, 2014).

L'externalisation des PS sur la surface des cellules est une transformation précoce de l'apoptose. Cette transformation a été mise en évidence dans le muscle du rat entre 1 et 24h *post-mortem* confirmant qu'après la saignée, les cellules musculaires meurent bien par apoptose (Becila *et al.*, 2010). L'inhibition de l'activité des aminophospholipides translocase (APT) et de l'activation de l'activité des scramblases expliquent l'exposition des PS dans les plaquettes activées (Verhoven *et al.*, 1995 ; Bratton *et al.*, 1997).

CHAPITRE III : SERPINES ET PREDICTIONS DE LA TENDRETE DE LA VIANDE

Des études ont permis de démontrer que le niveau d'inhibiteurs de protéases dans le muscle permettait de mieux prédire la tendreté de la viande que leurs enzymes cibles (Ouali et Talmant, 1990 ; Shackelford *et al.*, 1991). Ceci a justifié l'intérêt majeur porté pour les inhibiteurs de protéase dans les années suivantes (Ouali *et al.*, 1995). L'activité de ces systèmes protéolytiques est effectivement régulée par des inhibiteurs spécifiques. La calpastatine, par exemple, inhibiteur spécifique des calpaines, est l'inhibiteur de protéases le plus étudié dans les sciences de la viande. Nous savons aussi que l'activité des cathepsines est régulée par une famille d'inhibiteurs de cystéines peptidases connus sous le nom de cystatines mais encore peu étudiés dans le muscle.

Dans les sciences de la viande, il est généralement admis que le système calpain-calpastatine joue un rôle majeur dans l'attendrissage *post-mortem* de la viande. Cependant, le fait que d'autres protéases jouent également un rôle important a attiré l'attention. Des auteurs pensent en effet que la protéolyse *post-mortem* des protéines de viande est un processus multi-enzymatique impliquant un large ensemble de protéases. Dans ce contexte, la connaissance des fonctions biologiques spécifiques de ces protéases *in vivo* est une condition préalable à l'amélioration de notre compréhension des mécanismes d'attendrissage et de la recherche de marqueurs biologiques de la tendreté.

D'autres protéases n'ont toujours pas fait l'objet d'étude. C'est le cas du protéasome et, plus récemment, des caspases, un groupe particulier de cystéines peptidases responsables de la mort cellulaire programmée dans les cellules ou apoptose, phénomène observé dans le muscle *post-mortem* (Becila *et al.*, 2010).

En plus de cela, le tissu musculaire contient de nombreux autres groupes enzymatiques protéolytiques qui pourraient potentiellement dégrader un grand ensemble de protéines musculaires. C'est le cas des sérines peptidases musculaires (Sentandreu *et al.*, 2002).

La contribution des sérine protéases dans l'attendrissage de la viande n'a jamais été clairement démontrée mais plusieurs études ont identifié le niveau des inhibiteurs de la sérine-protéase musculaire comme l'un des meilleurs prédicteurs de la tendreté de la viande par rapport à la concentration de Calpains 1 et 2, des inhibiteurs de la calpastatine et des

cystéines protéase (Zamora *et al.*, 1996 ; Zamora *et al.*, 2005). Le fait que le niveau d'inhibiteurs des protéases est un meilleur prédicteur de la tendreté de la viande que leur enzyme cible justifie l'intérêt suscité pour leur identification et l'identification de leurs protéases cibles (Ouali et Talmant, 1990 ; Shackelford *et al.*, 1991).

Le taux d'inhibiteurs protéasiques musculaires influence la maturation *post-mortem* : plus l'inhibition est importante et moins la protéolyse des structures myofibrillaires est observée. En effet, c'est le rapport enzyme/inhibiteur, qui conditionne le degré d'attendrissage d'une viande (Ouali, 1991 ; Valin, 1995 ; Zamora, 1997).

III.1- Propriétés générales des serpins

Les serpins sont un groupe de protéines avec des similitudes structurales et capables d'inhiber les protéases. De nombreuses serpins inhibent les serines protéases et l'acronyme SERPIN a été proposé pour **SER**ines **P**rotéases **INH**ibitors. Plus de 3 000 serpins ont été identifiés et subdivisés en 16 sous groupes distingués par les lettres A à P. Il s'agit de 36 protéines humaines auxquelles il faut ajouter celles qui ont été identifiées chez les plantes, les champignons, les bactéries, les archées et certains virus (Law *et al.*, 2006 ; Olson et Gettins, 2011). Les Serpines sont donc la plus grande et la plus diversifiée famille d'inhibiteurs de protéases.

La plupart des serpins contrôlent les cascades protéolytiques, alors que certaines serpins n'inhibent pas les enzymes, mais remplissent d'autres fonctions telles que le stockage (ovalbumine), les protéines de transport d'hormone (thyroxine-binding globulin) et les gènes suppresseurs de tumeur (maspin). Toutes les serpins ne sont donc pas inhibitrices.

Les serpins inhibitrices ont été caractérisées comme des **inhibiteurs de classe croisée** puisqu'elles se sont révélées être capables d'inhiber d'autres groupes de protéinases, en particulier les cystéines peptidases (Silverman *et al.*, 2001 ; Gettins, 2002).

III.1.1- Structure des serpins

Les serpins se composent d'environ 350 acides aminés communs avec de légères modifications dues aux petites insertions ou délétions qui peuvent aboutir à des boucles ou allonger et raccourcir des hélices (Gettins, 2002a ; Olson et Gettins, 2011).

Dans sa structure tridimensionnelle, une serpine présente trois feuillets β (cinq A, six B et cinq C, de huit à neuf hélices α (hA à hI) et une boucle d'inhibition mobile

d'environ 20 résidus exposée à la surface et située à l'extrémité C-terminale (**FIGURE 07A**), reconnue par la protéase cible et dénommée *Reactive Center Loop* ou RCL. Cette boucle RCL contient le site actif qui et définit le modèle de spécificité enzymatique de chaque serpine (Lawrence *et al.*, 1994 ; Whisstock *et al.*, 1998 ; Gettins, 2002). Les feuillets β constituent le corps de la molécule, alors que les hélices et les boucles entourant ces structures, consolident la structure tertiaire (Pearce *et al.*, 2007).

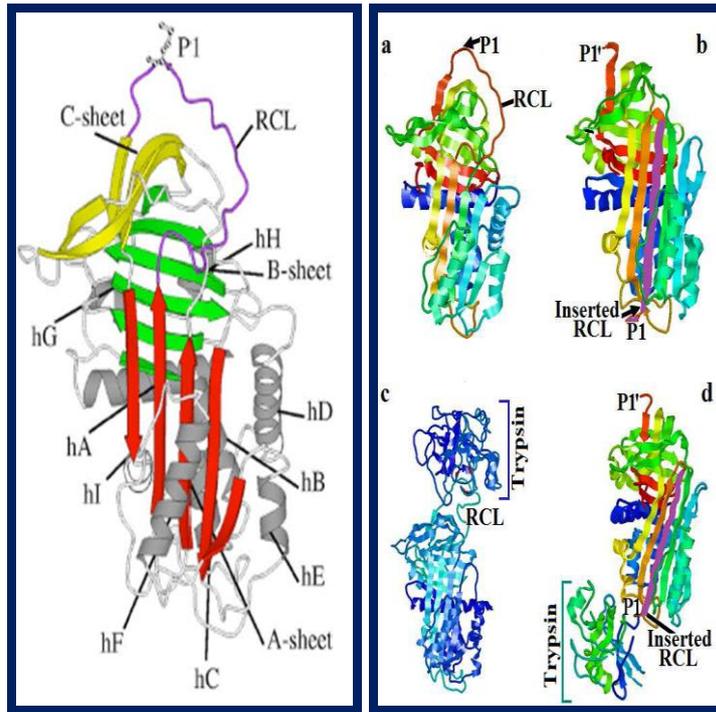


FIGURE 7A

FIGURE 7B

FIGURE 7A: Schéma de la structure d'une serpine (Silverman, 2001) ; **FIGURE 7B:** Structure et conformation de la serpine : a = α 1-AT native ; b = α 1-AT clivée. Lors du clivage, la boucle RCL s'insère dans le noyau de la serpine constituant un brin supplémentaire ; c = complexe de Michaelis entre la Serpin A1 et la trypsine ; d = complexe covalent entre l' α 1-AT et la trypsine. L'enzyme est transportée vers la partie distale de la serpine et subit une déformation irréversible responsable de l'inactivation de l'enzyme (Huntington *et al.*, 2000). Dans b et d, la boucle RCL insérée est en violet. AT = antitrypsine ou SERPINA1.

La conformation native de la serpine est une conformation dite « stressée S » très instable sur le plan thermodynamique (Whisstock et Bottomley, 2006). Ainsi comme nous le montrons sur la **FIGURE 7B**, lorsque la protéase se fixe sur le RCL, celui-ci s'insère dans le feuillet β A, formant ainsi le quatrième brin (s4A). La serpine adopte alors une conformation relaxée « R » beaucoup plus stable. Le gain d'enthalpie libre ΔG pouvant atteindre -32,2 kcal/mol (Im *et al.*, 2000 ; Boudier et Bieth, 2001).

En raison de son état métastable, la structure des serpines peut être facilement perturbée par des températures élevées ou par des mutations au niveau de la séquence primaire. Il s'ensuit un changement de conformation, qui mène à une transition vers des

formes inactives mais plus stables (Stein et Carrell, 1995 ; Benning *et al.*, 2004). La première structure cristalline élucidée, était celle de la SERPINA1 (α_1 -AT), considérée comme étant le modèle avec laquelle toutes les autres structures sont comparées (Loebermann *et al.*, 1984 ; Dafforn *et al.*, 2004 ; Marszal et Shrake, 2006).

III.1.2- Différentes conformations des serpinés

Des études cristallographiques (Whisstock *et al.*, 1998 ; Dafforn *et al.*, 2004 ; Marszal et Shrake, 2006) ont permis de montrer les quatre différentes conformations (latente, clivée, delta ou δ et polymérisée) que peuvent adopter les serpinés comme illustrées dans la **FIGURE 08**.

- 1- La forme **latente** est une forme non clivée dans laquelle la boucle RCL vient s'insérer prématurément dans le feuillet β A de la serpine devenant ainsi un brin antiparallèle (**Schéma A** de la **FIGURE 08**). Il s'agit d'une forme non inhibitrice due à l'insertion complète du RCL dans le feuillet β A. Cette forme révèle une stabilité élevée comparée à l'état natif, mais elle peut être convertie de nouveau en forme active (inhibitrice) par dénaturation (Lomas *et al.*, 1995 ; Wardell *et al.*, 1997). La serpine circulante ou SERPIN E1 (PAI-1), par exemple, adopte cette conformation de façon spontanée qui prolonge sa demi-vie (Mushunje *et al.*, 2004). La forme latente de la SERPIN A3, autre exemple, est déterminée comme composant mineur dans le plasma humain mais comme composant majeur dans le liquide des poumons chez des patients présentant une bronchite obstructive chronique avec emphysème (Berman *et al.*, 1986 ; Pearce *et al.*, 2010).
- 2- La forme **clivée** (**Schéma B** de la **FIGURE 08**) est une forme latente dans laquelle seule la partie clivée du RCL s'insère dans le feuillet β A pour former le 4^{ème} brin au centre des brins s3A et s5A avec séparation des résidus P1 et P1' à une distance de 70 Å au côté opposé de la molécule (Loebermann *et al.*, 1984; Mottonen *et al.*, 1992). Cette forme représente la conformation la plus stable avec une température de dénaturation >110 °C (Bruch *et al.*, 1988 ; Herve et Ghelis, 1990). Comme le RCL est inséré, la forme clivée n'est pas un inhibiteur de peptidases.

- 3- **La forme delta ou δ** (Schéma C de la **Figure 08**) est considérée comme une forme intermédiaire entre les formes native et latente puisqu'un fragment du RCL s'insère à une extrémité du feuillet β A jusqu'au résidu P12, et un fragment de l'hélice F s'insère à l'autre extrémité. La conformation δ a été retrouvée dans un variant de l' α 1-antichymotrypsine (Gooptu *et al.*, 2000). Elle présente une moindre stabilité par rapport aux conformations clivée et latente. Il s'agit d'une forme non inhibitrice de protéases.
- 4- **La forme polymérisée** (Schéma D de la **FIGURE 08**) correspond à un enchaînement de plusieurs molécules de serpinines dans lequel le RCL d'un monomère est complètement inséré dans le feuillet β A du monomère suivant. Selon Seyama *et al.* (1991), Stein et Carrell, (1995) et Benning *et al.* (2004), cette structure est rencontrée pour un mutant de la SERPIN A1 (l' α 1-antitrypsine : α ₁AT). *In vivo* la polymérisation se produit lorsqu'une mutation affecte la stabilité de la serpine native. Ceci aboutit à la formation de polymères dans la cellule en question et par conséquent une insuffisance d'activité de la serpine dans le plasma (Sivasothy *et al.*, 2000). Plusieurs structures de polymères ont été proposées d'après les interactions observées dans les formes cristallines des serpinines (Nar *et al.*, 2000 ; Carrell *et al.*, 1994). Dans ces cas, les polymères s'agrègent et précipitent dans la cellule, causant un ensemble de maladies nommées serpinopathies (Gooptu *et al.*, 2000 ; Lomas et Carrell, 2002), associées à la perte d'activité inhibitrice et à un dépôt excessif de serpinines dans les tissus (Stein et Carrell, 1995).

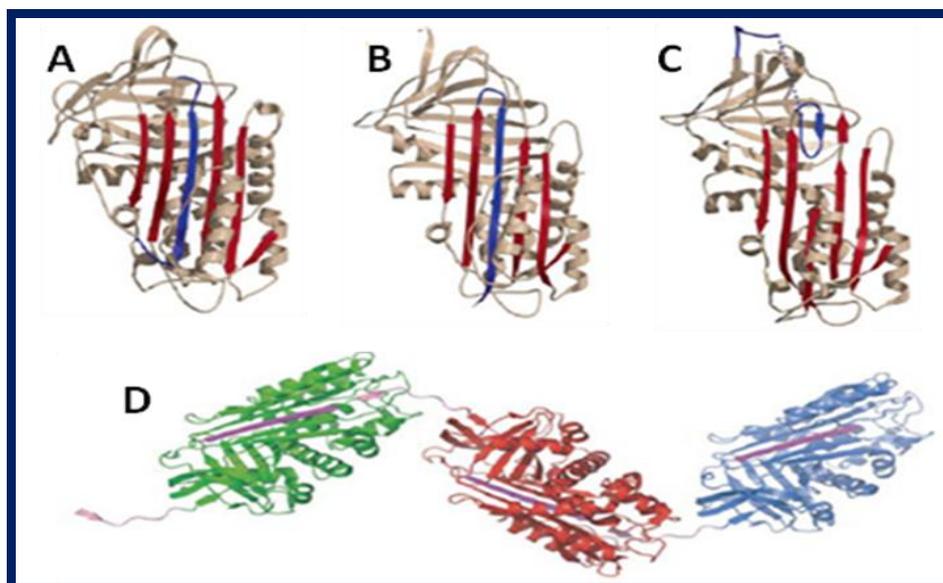


FIGURE 08 : Conformations latente (**A**), clivée (**B**), Delta ou δ (**C**) et polymérisée (**D**). La forme latente présente un RCL inséré dans le feuillet β . Dans la forme clivée, la serpine présente la même conformation que la forme latente avec un RCL clivé. Dans la conformation δ , le RCL (en bleu) est partiellement inséré dans le feuillet β A (en rouge). La forme polymérisée est une répétition d'unités dans laquelle le RCL d'un monomère d'une serpine est retrouvé dans le feuillet β d'une autre serpine (Gettins, 2002).

III.2- Mécanisme d'inhibition des serpinés

III.2.1- Boucle d'inhibition *Reactive Center Loop* (RCL)

La boucle d'inhibition RCL joue un rôle central dans les interactions serpinés-peptidases. Le site réactif, désigné par les résidus P1–P1', comporte le site actif qui interagit avec la protéase cible. Les résidus à la partie N-terminale du site du clivage sont indiqués par les résidus P_x (P17–P1) et les résidus à partie C-terminale sont indiqués par les résidus P' (Schechter et Berger, 1967). La composition du RCL en acides aminés ne détermine pas seulement la spécificité inhibiteur-protéase, mais elle est également importante dans le mécanisme d'inhibition. Les résidus P15–P9, composant la région de la charnière proximale, déterminent la capacité de la boucle à s'insérer lors du repliement (Hopkins *et al.*, 1993 ;Potempa *et al.*, 1994).

La séquence de la RCL définit donc le modèle de spécificité enzymatique de chaque serpine. Toutes les serpinés inhibitrices sont des inhibiteurs de protéases covalents, irréversibles et "suicides" formant un complexe covalent hautement stable avec leur enzyme cible. Ce complexe est détectable après électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans des conditions dénaturantes (SDS-PAGE) comme exposé par Silverman *et al.*, (2001); Silverman *et al.*, (2010); Whisstock *et al.*, (2010); Olson et Gettins, (2011).

III.2.2- Inhibition de type « suicide »

Les serpinés inhibent leurs protéases cibles par un mécanisme de substrat suicide qui conduit à la formation d'un complexe irréversible. Ils participent à un complexe covalent. Ce sont des « inhibiteurs suicides » (Patston *et al.*, 1991).

Les serpinés présentent un mécanisme d'inhibition spécifique et assez particulier (**FIGURE 09**). Ce mécanisme implique certaines modifications structurales majeures (Gettins, 2002 ; Olson et Gettins, 2011).

La première étape du processus d'inhibition est l'interaction du RCL avec le site actif de la protéase. Au début de la réaction, la protéase (**E**) forme avec l'inhibiteur (**I**) un complexe (**EI**) non covalent de type Michaelien via des interactions avec les acides aminés situés autour du site de coupure P1-P1' du RCL, où P1 est le résidu après lequel la protéase clive l'inhibiteur et libère le fragment C-terminal P1' à Px'. La sérine 195 du site actif de la protéase attaque la liaison peptidique située entre les résidus P1 et P1', formant ainsi une liaison acyl ester covalente entre la sérine et la fonction carbonyle du résidu P1. Après le clivage de la serpine et la formation d'une liaison covalente, le complexe formé ([EI']) devient stable thermodynamiquement (Lawrence *et al.*, 1995 ; Wright et Scarsdale, 1995 et Silverman *et al.*, 2001).

Le clivage de la boucle déclenche une modification dramatique de la conformation de la serpine. Elle passe de la conformation stressée (S) à la conformation relaxée (R) plus stable thermodynamiquement (Gettins, 2002 ; Gettins, 2007).

D'autre part, l'insertion du RCL clivé dans le feuillet β A entraîne la protéase liée de façon covalente. L'insertion complète du RCL permet le basculement de la protéase de 70 Å à l'autre extrémité de la serpine (Im *et al.*, 1999, Lee *et al.*, 2000, Silverman *et al.*, 2001). Ce mouvement provoque une libération d'énergie et se produit avec une constante d'association, k_4 . En parallèle, l'hélice hF se déplace pour permettre l'insertion du RCL (Gettins, 2002). Le basculement provoque une distorsion du site actif de la protéase cible due à sa compression (Huntington *et al.*, 2000 ; Dementiev *et al.*, 2006). La protéase est alors inactivée et incapable de se libérer du complexe formé avec la serpine. Elle est également plus sensible à la digestion protéolytique (Silverman *et al.*, 2001 ; Gettins, 2002).

Cependant, si l'insertion du RCL dans la molécule n'est pas suffisamment rapide, une déacylation du complexe survient et la réaction emprunte la voie du substrat, c'est-à-dire que la protéase peut accomplir la réaction d'hydrolyse avant que son activité ne soit entièrement compromise, ou il y a formation de la serpine clivée (**I*** sur la **FIGURE 09**) inactive et de la protéase libre active (Lawrence *et al.*, 2000), avec une constante d'association k_3 . Le rapport (k_3/k_4), aboutit à la « stoechiométrie d'inhibition » (SI), représentant le nombre de moles de serpine exigés pour former une mole du complexe covalent. Enfin, puisque le complexe covalent est seulement un intermédiaire cinétiquement emprisonné, il peut encore former les mêmes produits d'**I*** (inactif et stable) et d'**E** par une hydrolyse non catalytique, avec une constante d'association de k_5 (Gettins,

2002a ; Huntington, 2006 ; Gettins, 2007 ; Olson et Gettins, 2011)

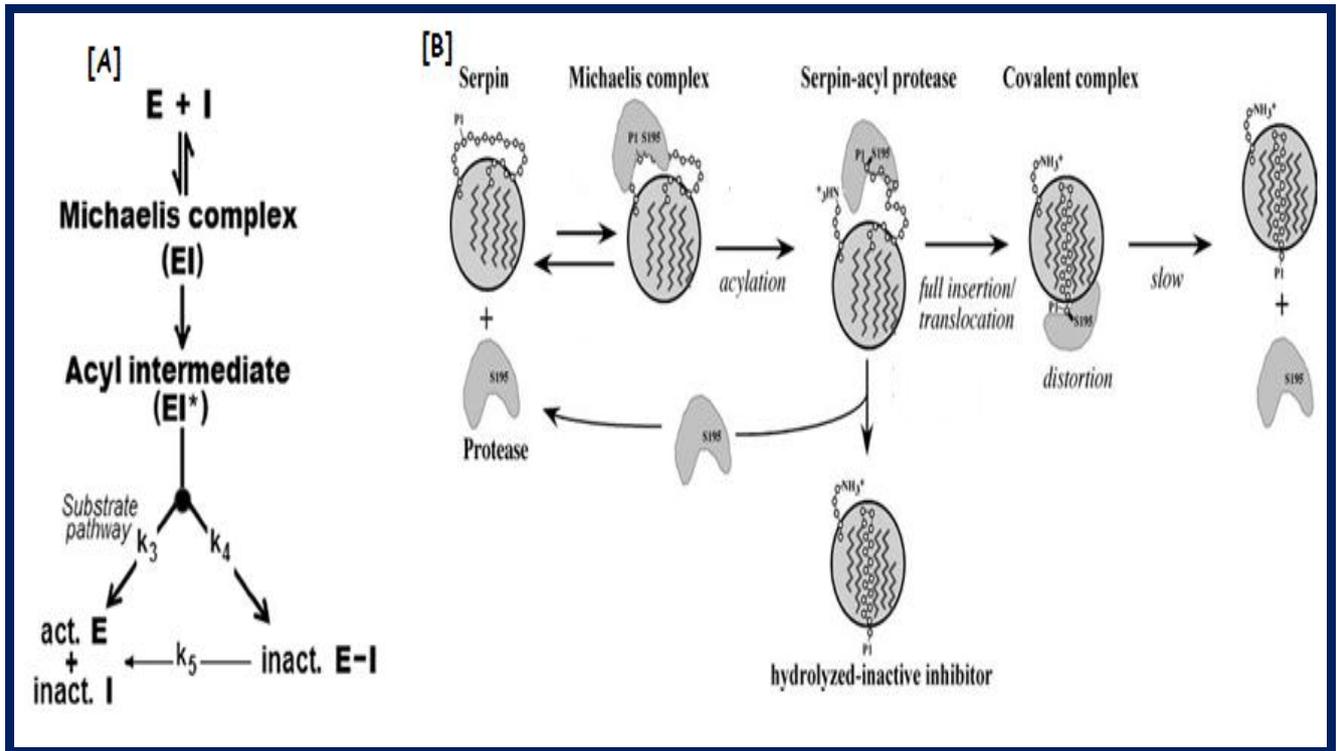


FIGURE 09 : Mécanisme d'inhibition des serpinés ([A] : Gagaoua *et al.*, 2015 ; [B] : Schechter et Plotnick, 2004)

Nous avons présenté plus haut dans les FIGURES 7 B et 9 B et nous présentons, ci après dans la FIGURE 10, l'exemple d'inhibition de la trypsine par l' α 1-antitrypsine, Lors du clivage de la RCL, la serpine adopte rapidement une conformation plus stable par insertion de la RCL dans la série des feuillettes β . Cette propriété est essentielle au mécanisme inhibiteur irréversible du substrat suicide des serpinés. Dans la voie inhibitrice, la protéinase forme un complexe non covalent de type Michaelis (Schéma B de la FIGURE 09) par des interactions avec des résidus flanquant la liaison (P1-P1'). L'attaque du site actif de la serine précisément sur la liaison (P1-P1') conduit à une liaison ester covalent entre le résidu Ser hautement réactif de la protéinase et le squelette carbonyle du résidu P1 et le clivage de la liaison peptidique. Il est probable que seulement à ce stade, avec l'élimination de la contrainte, la RCL commence à s'insérer dans les feuillettes β et à transporter la protéinase liée de manière covalente avec elle. Lors de l'insertion complète de la boucle, la protéinase est déplacée vers le côté distal de la serpine (Schéma d de la FIGURE 07 B). Cette translocation a induit une distorsion importante de la protéinase qui est devenue incapable de compléter le processus catalytique. L'énergie nécessaire pour

effectuer la distorsion peut provenir de la stabilité beaucoup plus grande de la conformation en boucle clivée par rapport à la conformation native.

En effet, les serpinines forment des complexes covalents avec leurs protéases cibles en piégeant l'enzyme et en la transportant vers l'extrémité distale du noyau de la serpine. Par conséquent, le changement structural conformationnel induit à l'enzyme ne permet pas de compléter la réaction hydrolytique (Gettins, 2002 ; Huntington, 2011).

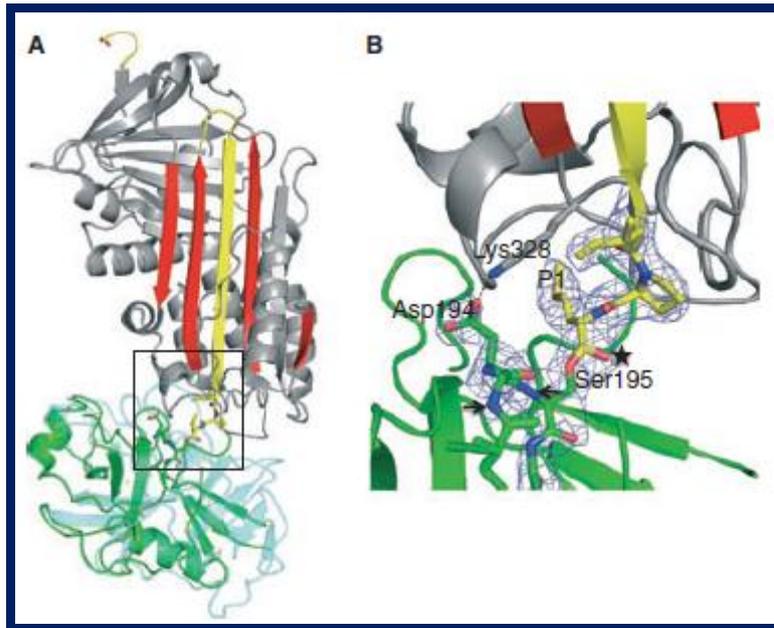


FIGURE 10 : Structure du complexe α 1 antitrypsine-trypsine (Huntington, 2011). La région P3-P1 de l' α 1AT et la boucle catalytique de la trypsine sont représentées sous forme de tiges. Un gros plan de la région A illustre la liaison covalente entre la Met de la région P1 de la serpin et la Ser 195 de la trypsine, y compris la densité électronique originale pour la région (fil bleu). Les flèches indiquent les atomes d'azote qui forment normalement le trou d'oxyanion (notez leur distance du carboxyle O du résidu P1, indiqué par l'étoile), et le nouveau pont de sel entre Asp194 de trypsine et Lys328 d' α 1AT est également indiqué.

III.2.3- Inhibition croisée ou « cross-class inhibition »

Certaines serpinines sont capables d'inhiber des peptidases à cystéine. Ce phénomène est appelé inhibition croisée ou « cross-class inhibition ». Selon Salvesen (1993), ceci peut être expliqué par le fait que la sélectivité des serpinines est due à la géométrie de la liaison avec le substrat et non pas au mécanisme catalytique des peptidases.

En effet, l'inhibition des cystéines peptidases par certaines serpinines est effectuée par un mécanisme irréversible similaire à celui mis en place pour les peptidases à sérine. Elles

formeraient un intermédiaire réactionnel thioacyle, permettant l'insertion du RCL lié à l'enzyme, la compression de la protéase et la modification de son site catalytique. Une liaison covalente entre la serpine CrmA et les caspases 1, 6 et 8 a été confirmée (Dobó *et al.*, 2006).

III.3- Fonctions biologiques des serpinines bovines dans le muscle

Au niveau du muscle squelettique bovin, une série d'inhibiteurs à sérine a été purifiée. (Ouali *et al.*, 1995 ; Rouchon, 1995 ; Tassy, 1998), deux serpinines ont été purifiées et identifiées par leurs séquences N-terminal comme l'antithrombine III et l'Endopine (Tassy, 1998). Deux autres serpinines de la famille des SERPIN A3 ont été extraites et caractérisées biochimiquement (Tassy *et al.*, 2005 ; Herrera-Mendez *et al.*, 2006). Ces deux serpinines initialement nommées mEndopine 1A et 1B sont aujourd'hui répertoriées dans les banques de données respectivement sous le nom de bovSERPIN A3-1 et bovSERPIN A3-3, (Pelissier *et al.*, 2008). Le gène codant ces inhibiteurs a été identifié et séquencé. Il est constitué de 4 exons et 3 introns (Péré-Brissaud *et al.*, 2015). Il s'agit en fait de deux membres d'une famille complexe de serpinines (bovSERPINA3-1, ..., bovSERPINA3-8) qui partagent une identité proche à 93%. Ces deux serpinines (bovSERPIN A3-1 et bovSERPIN A3-3), bien que très proches structurellement, présentent des variations en acides aminés, en particulier au niveau du site actif de leur RCL (Herrera-Mendez *et al.*, 2006). Elles sont également différentes de par leur degré de glycosylation qui peut justifier les modifications retrouvées au niveau des profils d'inhibition mesurés sur différentes classes de protéases commerciales (Blanchet *et al.*, 2012). Par exemple, la serpine bovSERPINA3-3 possède un poids moléculaire d'environ 75 kDa supérieure à sa masse théorique d'environ 47 kDa.

Les serpinines bovines ou bovSERPIN A3s englobent au moins 8 isoformes (Pelissier *et al.*, 2008). La plupart d'entre elles (6 sur 8) inhibent fortement des caspases initiateuses et effectrices et sont capables de former des complexes SDS avec ces dernières. Par conséquent ces caspases sont très probablement les protéases cibles naturelles *in situ* (Herrera-Mendez *et al.*, 2009) des serpinines. Comme elles se lient étroitement aux caspases, elles doivent être considérées comme des inhibiteurs efficaces du processus apoptotique caspase dépendant qui semble être le cas dans le muscle *post-mortem* (Ouali *et al.*, 2013). La seule autre serpine trouvée pour inhiber les caspases est le crmA

(modificateur de réponse de cytokine A) isolé du cowpox virus. Dans les cellules infectées, le crmA bloque le processus apoptotique lors de la multiplication du virus (Stennicke *et al.*, 2002, Dobo *et al.*, 2006).

En raison de leur capacité à inhiber les caspases initiatrices et effectrices, deux fonctions principales ont été identifiées pour les serpins. La première concerne la régulation de l'apoptose par inhibition pseudo-irréversible directe des caspases. La seconde est une conséquence de la première fonction, car les serpins contribuent probablement à la survie des cellules musculaires dans les deux premières phases de différenciation, (phases de prolifération et de confluence). Il a été constaté que pendant la différenciation des cellules musculaires, une résistance à la mort cellulaire a souvent été signalée dans les premiers stades de différenciation correspondant à la prolifération et à la confluence de myoblastes. La survie cellulaire est une condition préalable à la différenciation du myoblaste primaire (Lamkanfi *et al.*, 2007) et cette fonction pourrait être attribuée aux serpins inhibant totalement les caspases.

Matériel
et
Méthodes

PREAMBULE

Nous nous sommes fixés deux objectifs pour notre thèse :

1. Mettre en évidence l'ubiquité du phénomène d'apoptose chez différentes espèces bouchères et le poisson
2. Réaliser un état de l'art sur les serpinines bovines et leur rôle dans la transformation du muscle en viande.

Ces deux objectifs faisaient appel à des techniques très diverses et très différentes nécessitant le concours d'entités de recherche spécialisées dans chacune de ces techniques.

Pour notre premier objectif, nous avons travaillé au sein de l'équipe **MA**rqueurs de la **QUA**lité des **VI**andes (MAQUAV) du laboratoire de recherche universitaire **BIO**technologies et **QUA**lité des **AL**iments (BIOQUAL/INATAA/UFMC1). Nous y avons réalisé :

- 1-L'inversion de la polarité de la membrane cellulaire par immunohistochimie ;
- 2-L'altération des mitochondries avec libération du cytochrome c et son suivi par western blot, à l'aide d'un anticorps polyclonal ;
- 3-La dégradation de l'actine, protéine cible des caspases, et suivi de l'apparition des fragments d'actine par Western Blot.

Des coupes immunohistochimiques ont été réalisées au niveau du service d'Anatomie Pathologique du **C**entre **H**ospitalo **U**niversitaire (CHU) de Sétif.

Pour notre deuxième objectif, plusieurs séjours ont été programmés au niveau du Laboratoire **B**iochimie des **P**rotéines **M**usculaires (BPM), Unité **Q**ualité des **P**roduits **A**nimaux (QuaPA) à l'INRA de Theix-Clermont Ferrand dans le cadre d'un projet de recherche du programme algéro-français TASSILI. Nous y avons été initiée aux différentes techniques utilisées pour l'étude et la caractérisation des serpinines purifiées à partir du muscle de bovin (protocole de Herrera Mendez, 2006) notamment les techniques de Chromatographie utilisant le système **F**ast **P**rotein **L**iquid **C**hromatography (FPLC). Nous avons aussi pu y réaliser les observations de nos coupes tissulaires par microscopie à fluorescence.

Chapitre I : UBIQUITE DU PHENOMENE D'APOPTOSE CHEZ DIFFERENTES ESPECES BOUCHERES

Dans ce chapitre, nous présenterons notre étude sur trois marqueurs d'apoptose majeurs pour la mise en évidence de :

- 1- La dégradation de l'actine, première protéine cible des caspases, chez différentes espèces bouchères (volaille, caprin, bovin, ovin, camelin) au stade de la maturation et une étude cinétique de cette dégradation couplée à l'évolution du pH post mortem chez *Cyprinus carpio* (carpe commune), un poisson d'eau douce ;
- 2- L'externalisation des phosphatidylsérines membranaires chez *Cyprinus carpio* ;
- 3- relargage mitochondriale du cytochrome c au cours du temps post mortem chez *Cyprinus carpio*.

I.1- Mise en évidence de la dégradation d'actine chez plusieurs espèces bouchères

L'objectif était la mise en évidence du processus d'apoptose dans le muscle *Longissimus dorsi* de différentes espèces (volaille, caprin, bovin, ovin, camelin et carpe commune) par l'étude de l'un des marqueurs biochimiques qui est la dégradation de l'actine au cours de la maturation.

I.1.1- Matériel biologique

Nous avons travaillé sur le muscle long dorsal (*longissimus dorsi*) des différentes espèces suivantes : volaille (poulet de chair), caprin (bouc), camelin (dromadaire), bovin (bœuf), ovin (mouton), poisson marin et poisson d'eau douce (la carpe). Les différents muscles étaient au stade de maturation (48 h *postmortem* pour le bovin, ovin, caprin ; 24 h pour le poulet et 9 h pour la carpe). Nous précisons l'âge des animaux dans la **FIGURE 11**.

Espèce et âge	Avant découpage	Après découpage	Pour extraction
BOVIN Taureau de 28 mois			
OVIN Agneau de 9 mois			
CAPRIN Bouc de 24 mois			
VOLAILE Poulet de 2,5 mois			
CAMELIN Jeune dromadaire (Chamelon) de 18 mois	 <p data-bbox="914 1451 1374 1525">L'échantillon pour extraction a été prélevé de la zone cerclée en blanc.</p>		
POISSONS Carpe commune 9 h <i>post mortem</i>	 <p data-bbox="898 1767 1390 1841">L'échantillon pour extraction a été prélevé de la zone délimitée en blanc.</p>		

FIGURE 11 : Muscle *Longissimus dorsi* des sept espèces étudiées

I.1.2- Préparation des extraits des différents muscles

Pour l'extraction des Protéines Myofibrillaires (PMF), nous avons utilisé le protocole de Zamora (1997) mais avec une vitesse de centrifugation de 3 800 rpm au lieu de 10 000 rpm. Cette modification nous a été imposée par les limites de la centrifugeuse disponible au laboratoire (Voir **FIGURE 12**, page suivante).

Le culot des myofibrilles avait été obtenu à partir de 1 g de muscle broyé dans la solution d'extraction (NaCl 150 mM, KCl 25 mM, MgCl₂ 3 mM et EDTA 4 mM à **pH 6,5**), homogénéisé 15 sec au polytron et filtré sur gaze pour éliminer la fraction insoluble, notamment le collagène et le gras. Le filtrat a été incubé à 4 °C pendant 30 min sous agitation constante et modérée pour une meilleure solubilisation des PMF. La séparation des PMF a été effectuée par fractionnement en centrifugeant l'extrait à 3 800 rpm pendant 15 min à 20°C. Le culot a été ensuite lavé 2 fois dans un tampon (KCl 50 mM, β-Mercaptoethanol 5 mM et EDTA 1 mM à **pH 6,5**) afin d'éliminer les protéines sarcoplasmiques et les membranes.

I.1.3- Dosage des protéines par la méthode Bradford

Le dosage des protéines des surnageants et des culots devait nous permettre d'obtenir la même quantité de protéines dans chaque puits.

Le dosage des protéines a été réalisé par la méthode de Bradford (1976). C'est une méthode colorimétrique permettant la mesure de la fixation du bleu de Coomassie G-250 sur les liaisons peptidiques en milieu acide.

Le réactif de Bradford (réactif Bio-rad : acide phosphorique et méthanol) est rouge-brun à l'état libre et, lié aux protéines, il prend une teinte bleue avec un coefficient d'extinction molaire élevé à 595 nm qui rend le dosage protéique très sensible. L'intensité de la coloration est ainsi proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans l'échantillon. La mesure de la DO à 595 nm a été effectuée avec un spectrophotomètre Beckman.

Nous avons travaillé avec deux gammes d'étalonnage : 0 à 25 µg/ml et 0 à 1,3 mg/ml. Les gammes d'étalonnage ont été réalisées avec l'immunoglobuline de lapin. Les courbes d'étalonnage ont été tracées avec un tableur. Les absorbances ont été reportées sur la courbe d'étalonnage pour la détermination des concentrations.

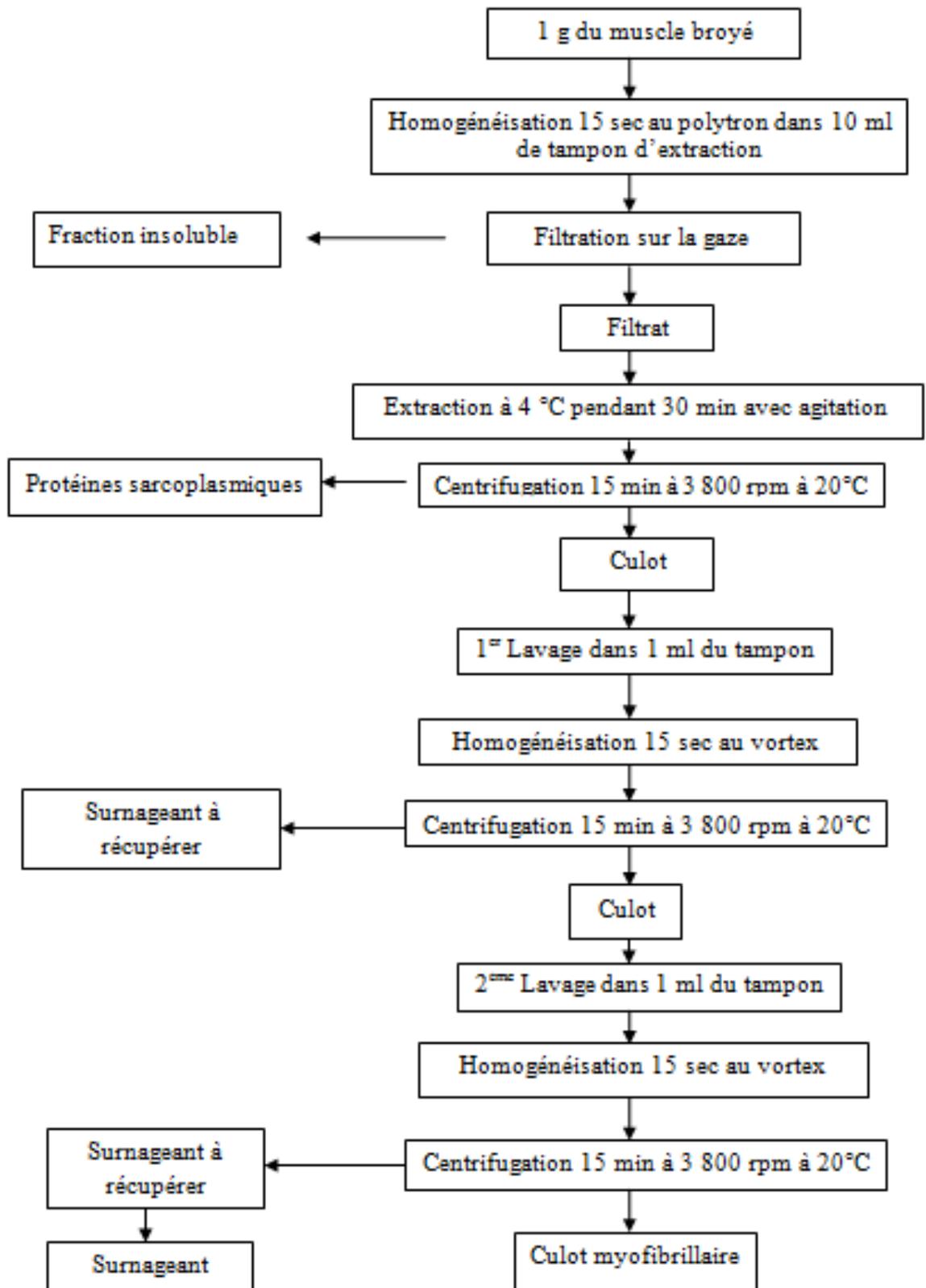


FIGURE 12 : Protocole d'extraction des protéines myofibrillaires (Zamora, 1997 modifié)

I.1.4- Electrophorèse et Western Blot

La technique Western Blot (ou immunoblot) a été utilisée pour détecter la présence d'une protéine cible dans un échantillon à l'aide d'un anticorps dirigé contre cette protéine. Nous avons adopté le protocole décrit par Sentandreu *et al.* (2003).

Cette technique utilise d'abord l'électrophorèse pour séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire. Ces protéines sont ensuite transférées sur une feuille Difluorure de polyvinylidène (PVDF, Sigma P2563). La feuille PVDF est subit une trois incubations successives avec l'anticorps primaire spécifique à la protéine d'intérêt qui est l'actine, puis l'anticorps secondaire marqué à la phosphatase alcaline dirigé contre l'anticorps primaire « I » suivi du substrat spécifique de l'enzyme. Cette méthode utilise des substances chimiques qui émettent une luminescence directement proportionnelle à la concentration en protéines présentes et qui impressionne un film photographique (Lubert *et al.*, 2003).

Pour la réalisation du Western Blot nous devons préalablement séparer les protéines selon leur poids moléculaire à l'aide d'une électrophorèse unidimensionnel en milieu dénaturant en présence de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) qui permet de charger négativement toutes les protéines.

La dénaturation a été faite avec une solution de dénaturation composée de Tris-HCL 312,5 mM, EDTA 0.4 mM, DTT 150 mM, SDS 7.5 %, Bleu de bromophenol 0.05 % et Glycérol 25 %. Le DTT est un agent réducteur des groupements disulfures –SH et S-S. Le glycérol sert à augmenter la densité de l'échantillon afin d'éviter les contaminations lors du dépôt sur le gel.

Lors de l'étape de dénaturation, les extraits (culots et surnageants) additionnés de tampon de dénaturation ont été chauffés à l'eau bouillante pendant 5 min dans afin d'éliminer la protéolyse bactérienne et l'action des protéases et faciliter la rupture des ponts –SH. Elle permet aussi de compléter la dénaturation provoquée par le SDS, donnant ainsi aux protéines leur structure linéaire (Porzio et Pearson, 1979).

Une fois dénaturées, les échantillons de PMF ont été conservées à une température de -20 °C jusqu'à leur utilisation.

L'électrophorèse (SDS PAGE) a été réalisée suivant le protocole de Laemmli (1970). Le gel de concentration (stacking) avec 7,5 % d'acrylamide a été placé au dessus du gel de séparation (resolving) à 12 % d'acrylamide.

Le gel de séparation, dont la polymérisation commence dès l'addition de persulfate d'ammonium et du N,N,N',N'-TétraMéthylEthylèneDiamine (TEMED), a été coulé entre deux plaques de verre et recouvert par un volume d'éthanol et d'eau pure à 1:1. Cette solution permet d'assurer la planéité du gel (resolving) et empêcher le contact avec l'air qui peut gêner l'homogénéité de la polymérisation. Après polymérisation complète, l'éthanol et l'eau ont été éliminés du gel de resolving. Le gel de concentration a été ensuite coulé, surmonté immédiatement d'un peigne et laissé pour polymérisation.

Les échantillons protéiques préalablement colorés au bleu de bromophénol, permettant de suivre le front de migration, ont été déposés dans les puits formés par le peigne. Chaque puits est rempli de 5 à 20 µl d'échantillons de protéines et un puits a été réservé aux protéines de référence. Les protéines de référence sont des marqueurs de différentes masses moléculaires : 250 KDa , 150 KDa, 100 KDa, 75 KDa, 50 KDa, 37 KDa, 25 KDa, 20 KDa et 15 KDa (BIO-RAD 161-0373). Les protéines chargées négativement migrent vers l'anode. La structure primaire des protéines permet leur migration à travers le gel d'acrylamide. Elles se séparent selon leur poids moléculaire : les protéines de grandes tailles auront des difficultés à traverser les « mailles » du gel acrylamide.

L'ensemble a été mis dans une cuve d'électrophorèse (Figure 13) remplie de tampon de migration (Tris 0.025 M, Glycine 0.192 M, MCE 0.05 % et SDS 0.1 % à pH8.3). La migration s'effectue en premier lieu à 80 V pendant 20 min environ pour favoriser l'entassement des protéines dans le « stacking », puis à 120 V pendant 2 h dans le gel de « resolving » (gel de séparation) pour séparer les protéines selon un gradient de taille. Toute cette opération a été réalisée à température ambiante.

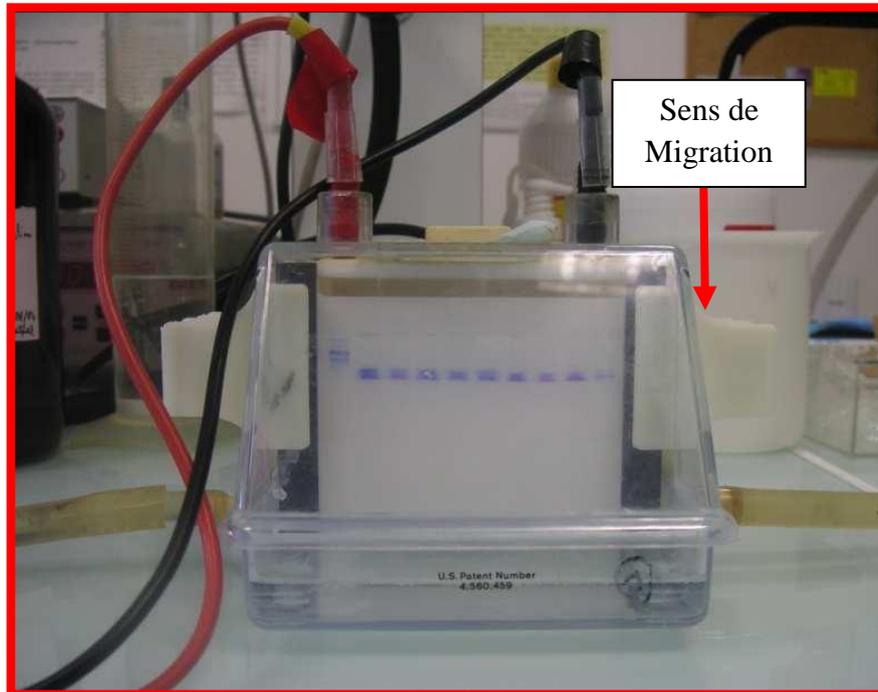


Figure 13 : Dispositif électrophorétique

Après séparation des protéines, le gel d'acrylamide a été démoulé et le « stacking » enlevé.

Pour chaque manipulation, deux gels ont été préparés avec les mêmes échantillons. Un gel coloré au bleu de Coomassie ou au nitrate d'argent pour révéler toutes les protéines séparées et un second gel non coloré pour la révélation de la dégradation de l'actine par Western Blot.

I.1.4.1 Coloration des gels

Pour mettre en évidence les protéines séparées, deux méthodes de coloration des protéines ont été utilisées. La première coloration est au bleu de Coomassie. La seconde coloration à l'argent, 100 fois plus sensible que la première, permet de révéler des protéines de plus faibles concentrations.

- Coloration au bleu de Coomassie R-250

Après migration, les protéines ont été fixées dans une solution d'éthanol 30%, acide acétique 5%, puis colorées dans la même solution contenant 0,12% de bleu de Coomassie R-250. Lors de cette coloration, le bleu de Coomassie se fixe aux acides aminés basiques

(notamment Arg) et aromatiques (Phe, Tyr et Trp). Le gel a été ensuite décoloré avec la même solution ayant servi à la fixation des protéines.

- Coloration au nitrate d'argent

Nous avons adapté le protocole décrit par Yan *et al.* (2000). Il s'agit d'une coloration à l'argent de petits gels et compatible avec spectrométrie de masse, utilisant un volume total de 50 ml de cinq solutions fraîchement préparées : A, B, C, D, et E.

Après migration, le gel a été plongé et laissé se fixer deux fois 15 minutes sous agitation dans la solution de fixation A contenant 10 % d'acide acétique et 40 % d'éthanol. Il a été ensuite immergé dans la solution de sensibilisation B contenant l'éthanol 30 %, le sodium thiosulfate 0,2% et le sodium acétate 6,8 % pendant 30 minutes. Trois lavages à l'eau pure ont été ensuite réalisés pendant 5 minutes. La coloration avec la solution C au nitrate d'argent 0,25 % à l'abri de la lumière a duré 20 minutes (la solution avait été préparée au dernier moment car très sensible à la lumière). Deux lavages de 1 minute avec l'eau pure ont été effectués. Le gel d'acrylamide est ensuite plongé dans la solution de développement D (sodium carbonate 2,5 %, formaldéhyde 0,04 %) jusqu'à obtention de la coloration désirée. Enfin, le gel a été laissé pendant 10 minutes dans la solution stop E (1,46 % d'EDTA qui permet d'arrêter la réaction de coloration des bandes protéiques). Le protocole a été achevé avec 3 lavages de 5 minutes en eau pure.

I.1.4.2- Révélation de la dégradation d'actine par Western Blot

Après migration, le gel a été démoulé et rincé dans un tampon de transfert contenant du Tris 48 mM, glycine 39 mM, éthanol 20%, **pH 8.7**. Les protéines ont été ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose de type Immobilon P en PVDF (Sigma P2563). La membrane avait été préalablement plongée dans l'éthanol pur pendant 5 min, puis rincée abondamment à l'eau et enfin trempée pendant 2 min dans le tampon de transfert.

Nous avons utilisé une méthode de transfert semi-sec qui consiste à prendre en sandwich le gel et la membrane entre deux feuilles de papier absorbant (papier blotting Sigma) imbibées dans le tampon de transfert qui assure la conductivité du montage (**FIGURE 14**). Le recours à l'éthanol permet d'activer le gel en enlevant le SDS des protéines et augmenter les possibilités de liaisons hydrophobes protéines-membrane. Le transfert a été

réalisé pendant 30 min pour un seul gel (6 x 9 cm) et pendant 1 heure pour deux autres gels sous 10 V. Durant cette phase, les protéines chargées migrent depuis le gel vers la membrane en conservant l'organisation relative qu'elles avaient dans le gel. Il en résulte que les protéines sont exposées sur une surface mince facilitant les étapes de détection ultérieures.

Le transfert des protéines du gel acrylamide vers la membrane PVDF a été réalisé dans une cuve de transfert Thermo-scientific OWL HEP-1 sous une tension de 10 V pendant 30 min par membrane de 6 x 9 cm en « sandwich » (**FIGURE 14**). Le sandwich de transfert a été réalisé avec un blotting paper Sigma, humidifié avec du tampon de transfert et déposé dans la cuve à transfert (Anode). Sur le blotting paper, nous avons déposé le gel acrylamide puis la membrane PVDF. Un autre blotting paper a été déposé par-dessus pour achever le « sandwich » de transfert. .

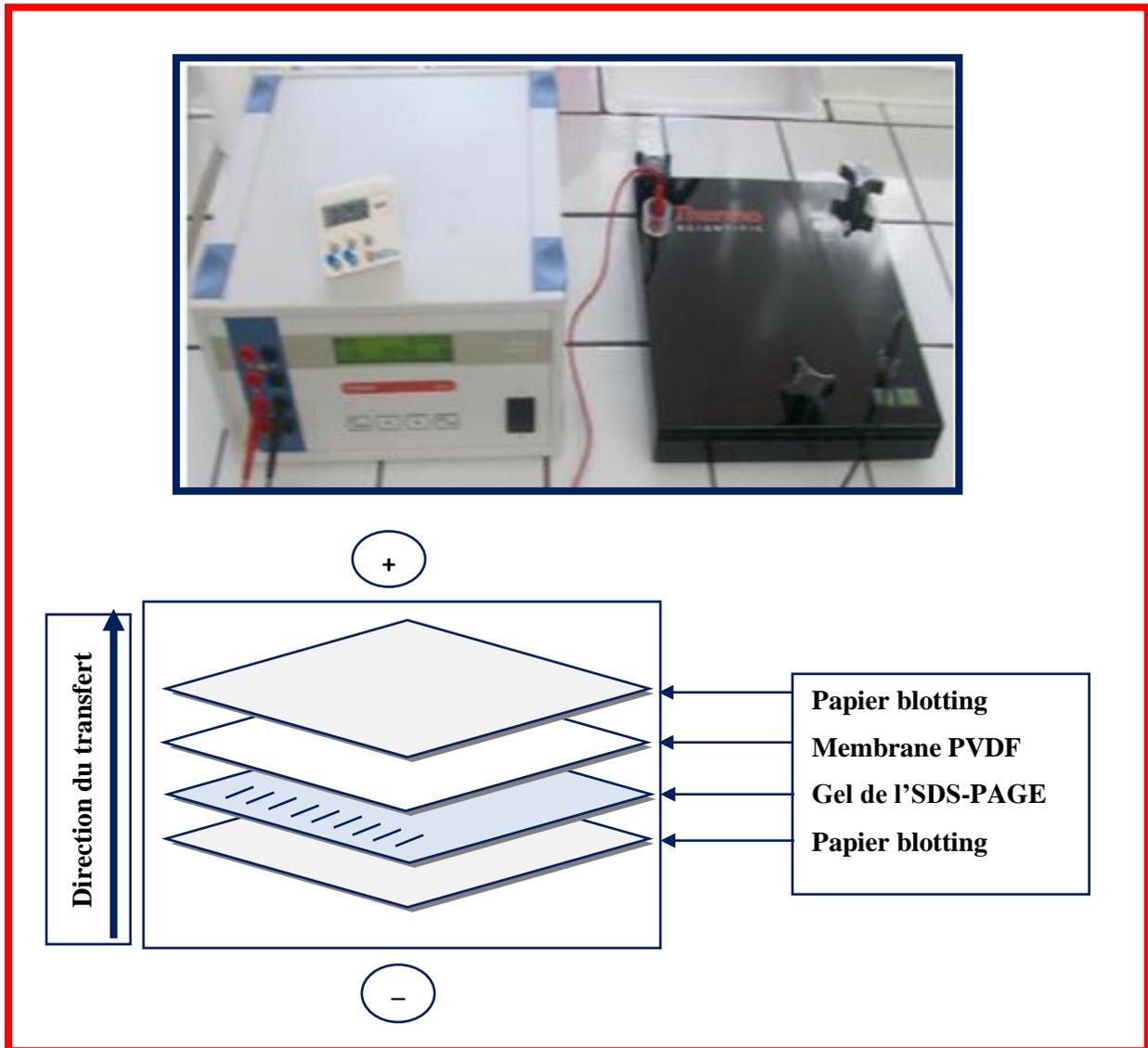


FIGURE 14 : Appareil de transfert et « sandwich » de transfert pour le Western Blot sous une tension de 10 V

À la fin du transfert, la membrane a été saturée dans le tampon de saturation (PBS 1X + 10 % lait écrémé + Tween 20 à 0,1 %) pendant 1 h à température ambiante ou une nuit à 4°C. La membrane a été lavée 2 fois 5 min avec du tampon de lavage/dilution (PBS 1X, Tween 0,1 %, lait 1 %).

Après saturation des sites non spécifiques, la membrane a été incubée pendant 1 h à température ambiante sous agitation douce avec le premier anticorps polyclonal (dilué au 1/500^{ème} dans du PBS contenant 1% de lait écrémé) dirigé contre l'actine.

Après incubation avec l'anticorps primaire, la membrane a été lavée 4 fois 5 min avec le tampon PBS contenant 1% de lait écrémé, puis incubée avec l'anticorps secondaire commercial de chèvre anti-IgG de lapin conjugué à la phosphatase alcaline (Jackson ImmunoResearch) dilué au 1/2000^{ème} dans du PBS contenant 1% de lait écrémé pendant 1 h sous agitation et à l'abri de la lumière.

Après incubation, la membrane a été lavée 4 fois 5 min avec le tampon lavage/dilution puis 2 fois 2 min avec le tampon PBS 1X sans lait ni Tween.

L'activité de l'enzyme (phosphatase alcaline) a été révélée par un kit de chimioluminescence après incubation 5 min avec 1,5 ml de Lumiphos (Thermo Scientific) (substrat spécifique de la phosphatase alcaline), puis égouttée avant sa mise entre deux feuilles plastiques transparentes. La réaction de l'enzyme avec le substrat émet de la lumière au niveau de la bande protéique d'intérêt (actine et ses fragments). Cette bande impressionne, après un temps variable selon l'intensité émise, un film autoradiographique. L'ensemble membrane-feuilles a été mis à l'abri de la lumière dans une hypercassette (Thermo Scientific).

La révélation des fragments d'actine a été réalisée dans une chambre noire sous une lampe rouge Fischer GmbH (230 V, 15 W) où la membrane a été mise en contact d'un film photographique (Hyperfilm, Amersham) avec un temps d'exposition variant de 5 à 30 min selon l'intensité du signal.

Ce film a été plongé dans un bac de révélateur photo Sigma jusqu'à apparition des bandes, rincé immédiatement dans un bac d'eau puis plongé 30 sec dans le bac contenant le fixateur avant de terminer par un lavage à l'eau.

Le résultat a été observé sur le film. Le temps d'exposition a été ajusté avec un nouveau film si nécessaire.

I.1.4.3- Lecture des gels colorés de l'électrophorèse et des films du Western Blot

Pour la détermination du poids moléculaire (PM) des différentes bandes protéiques sur le gel coloré au bleu de Coomassie ou au nitrate d'argent ainsi que les bandes de dégradation d'actine sur les films du Western Blot, nous avons calculé le rapport frontal (Rf) correspondant à la mobilité des différentes protéines sur le gel en utilisant un tableur.

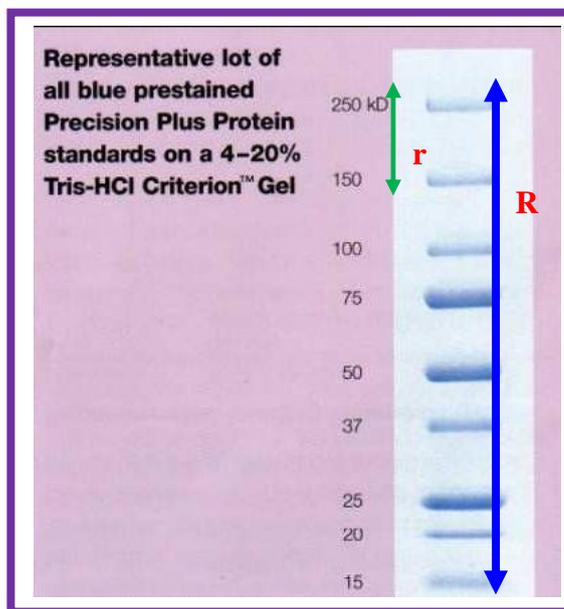
Les protéines de référence Biorad (**FIGURE 15**) avec leur PM connu et leur rapport frontal de migration (mobilité) calculé permettent de tracer la courbe d'étalonnage du gel qui donne l'équation du logarithme du poids moléculaire en fonction du Rf.

$\text{Log PM} = f(\text{Rf})$ où :

- $\text{Rf} = r/R = \text{Distance parcourue par la protéine (voir figure 15)}$
- $R = \text{Hauteur totale du gel à parcourir}$

L'équation est de type : $y = Ax + B$ où $y = \text{Log PM}$ et $x = \text{Rf}$

Les PM des protéines ont été déterminés à partir des courbes d'étalonnage.



$\text{Log (PM)} = \text{mobilité relative (r/R)} = f(\text{Rf})$

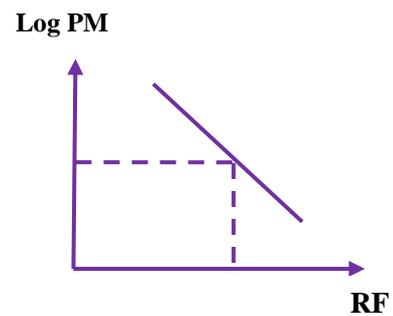


FIGURE 15: Principe de détermination des poids moléculaires

I.2- Mise en évidence de l'inversion de la polarité de la membrane cellulaire chez *Cyprinus carpio*

La révélation de l'inversion de la polarité au niveau de la membrane cellulaire lors de l'apoptose a été réalisée par immunocytochimie avec l'annexine V marquée à la Fluorescéin IsoThioCyanate (FITC).

L'annexine V est une protéine présentant une très forte affinité pour la phosphatidylsérine, exposée sur le feuillet externe de la membrane des cellules apoptotiques. La fluorescence dans l'espace extracellulaire prouve que les phospholipides ont été transférés sur la face externe de la membrane. Les cellules mortes par apoptose fluorescent en vert.

Afin de s'assurer que le premier marquage est à l'extérieur de la cellule musculaire, nous avons réalisé un deuxième marquage de la laminine. La laminine est une glycoprotéine de la membrane basale des cellules jouant un rôle dans l'attachement et la migration des cellules lors de l'embryogenèse. Cette protéine est révélée avec un anticorps secondaire marqué à la cyanine 3 fluorochrome qui donne une fluorescence rouge.

I.2.1- Matériel biologique

Nous avons choisi *Cyprinus carpio* (carpe commune) car c'est l'espèce la plus abondante donc la plus disponible et la plus facile à capturer.

De taille comprise entre 15 et 20 cm, les carpes ont été capturées vivantes au niveau du barrage de Beni-Haroun (Wilaya de Mila). Nous les avons transportées vivantes vers le laboratoire dans des bacs remplis d'eau du barrage. Au laboratoire, les carpes ont été aussitôt mises dans un aquarium rempli d'eau de source et muni d'un système d'oxygénation. Les carpes ont séjourné dans l'aquarium 48 h au moins. Il s'agissait d'une période d'adaptation afin d'éliminer l'effet du stress. Durant cette période, les carpes ont été nourries avec des flocons pour poissons d'aquarium disponibles sur le marché.

Après avoir été extraites de l'aquarium, les carpes ont été étêtées, éviscérées, emballées dans des sacs en plastique imperméable puis conservées dans des bacs de glace pilée pour maintenir la température du muscle entre 0 et 4°C. Pour le double marquage à l'annexine V et de la laminine, nous avons prélevé des échantillons de 2 à 3 cm du muscle long dorsal (*Longissimus Dorsi*) aux temps 0, 6 et 24 h *post mortem*.

I.2.2- Marquage à l'annexine V

Les échantillons de muscle ont été maintenus par des aiguilles sur du liège et immergés dans une solution de fixation (paraformaldéhyde 1%, glutaraldéhyde 0,1%, sucrose 0,1M, tampon phosphate de sodium 0,1M, pH 7,2) pendant 15 min.

Ces échantillons de muscle ont été ensuite rincés trois fois dans du PBS (Phosphate Buffer Saline : KH_2PO_4 à 1,5 mM, Na_2HPO_4 à 8 mM, NaCl à 137 mM, KCL à 2,7 mM, pH 7,4) pendant 5 min puis incubés avec de l'Annexine V marquée à la FITC (Sigma-Aldrich A9210, Saint-Quentin Fallavier, France) diluée au 1/150^{ème} dans du tampon PBS (concentration finale de 1,8 µg/ml) pendant 24 h à 4 °C avec une agitation douce et à l'abri de la lumière.

Le poisson a été conservé dans de la glace entre 0 et 4°C pour les prélèvements à 6 et 24 h *post mortem*. Des échantillons identiques de muscle ont été prélevés et traités de la même manière et dans des conditions semblables au prélèvement à 0 h *post mortem*.

Des échantillons témoins ont été traités dans les mêmes conditions en incubant des morceaux du muscle long dorsal à 0, 6 et 24 h *post mortem* dans une solution de PBS sans Annexine V.

Après 24 h d'incubation avec l'Annexine V, les échantillons de muscle ont été rincés trois fois dans du PBS pendant 5 min. Les morceaux du muscle sont fixés sur un moule de liège adapté à la taille de notre échantillon à l'aide d'une résine fluide à température ambiante qui durcira à la congélation (Tissutech, Labonord). Les échantillons ont été congelés à -80°C dans de l'isopentane ou 2-méthylbutane (Prolabo) refroidi dans de l'azote liquide pendant 1 à 2 min selon la taille de l'échantillon.

La congélation rapide en isopentane refroidi à l'azote liquide à -80°C permet de préserver au mieux la structure tissulaire car elle permet d'empêcher la formation de gros cristaux dommageables aux tissus. De plus et contrairement à l'azote liquide, l'isopentane ne dégaze pas au contact de l'échantillon (du tissu) évitant ainsi les risques de fractures qui sont des possibilités de dégradations.

Des coupes transversales de 10 µm d'épaisseur ont été réalisées avec un Cryostat Microm HM525 (Thermo Scientific). Ces coupes ont été séchées à l'air libre et à l'abri de la lumière. Après séchage, les coupes ont été fixées pendant 15 min avec une solution PBS

contenant 2% de formol puis rincées pendant 5 min avec du PBS (exempt de formol). Après égouttage des lames, nous avons ajouté entre lame et lamelle des gouttes du liquide de montage Aquemous Mounding Medium. Nous avons laissé sécher avant d'observer au microscope à fluorescence Nikon Labphot2 à une longueur d'onde d'excitation $\lambda_{exc}=488$ nm et à une longueur d'onde d'émission $\lambda_{emm}=530$ nm. Les images ont été visualisées à l'aide d'une caméra reliée à un ordinateur et le logiciel VISILOG pour la capture d'images. Les critères d'évaluation étaient « présence » ou « absence » de marquage.

I.2.3- Double marquage de la laminine

Le marquage de la laminine a été réalisé directement sur des coupes transversales des muscles déjà marquées à l'annexine V. Toutes les étapes de ce marquage ont été faites à l'abri de la lumière pour éviter la perte du premier marquage avec FITC.

Après séchage, fixation et rinçage des coupes, les sites non spécifiques ont été saturés par une solution de PBS contenant 10% de sérum de chèvre (Sigma S2007) pendant 30 min. Après lavage, les coupes ont été incubées en chambre humide avec le premier anticorps dirigé contre la laminine produit chez le lapin (Sigma L9393) dilué au 1/100^{ème} dans une solution de PBS pendant 1 h à température ambiante. Trois rinçages de 10 min chacun ont été ensuite effectués avec du PBS. Enfin le deuxième anticorps anti IgG de lapin marqué à la cyanine 3 produit chez la chèvre (Santacruz SC-58797) a été utilisé à la dilution de 1/150^{ème} et l'incubation a eu lieu à température ambiante durant 1 h. De nouveau, trois lavages au PBS ont été effectués pour éliminer les anticorps marqués non fixés. Des gouttes d'agent Aquemous Mounding Medium comme liquide de montage ont été rajoutées entre lame et lamelle. Après séchage, nous sommes passés à l'observation au microscope à fluorescence (Nikon Labphot2). Les observations ont été faites à une longueur d'onde d'excitation $\lambda_{exc}=554$ nm et à une longueur d'onde d'émission $\lambda_{emm}=568$ nm. Les images ont été visualisées à l'aide d'une caméra reliée à un ordinateur et le logiciel VISILOG pour la capture d'images.

I.3- Mise en évidence de la dégradation d'actine et de la libération mitochondriale du cytochrome c au cours du temps post mortem chez *Cyprinus carpio*

Nous avons étudié l'évolution du pH musculaire au cours du temps *post mortem* concomitamment à la dégradation d'actine (protéine cible des caspases) et la libération mitochondriale du cytochrome c.

I.3.1- Matériel biologique

Nous avons effectué notre étude sur le muscle long dorsal « *longissimus dorsi* » de la carpe commune à différents temps post mortem : 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10 et 24 h. Les carpes ont été capturées du barrage Beni-Haroun et traitées comme présenté au paragraphe I.2.1. Les morceaux de muscle prélevés sur ces carpes ont servi à la mesure du pH et à l'extraction des protéines myofibrillaires (PMF). Les PMF ont servi à la réalisation du profil électrophorétique et des Westerns Blots pour la mise en évidence de la dégradation de l'actine et la libération mitochondriale du cytochrome c.

I.3.2- Mesure du pH

Pour la mesure du pH, un échantillon de 0.5 g de muscle a été finement découpé avec un bistouri. Nous avons ajouté 9 volumes d'iodoacétate de Sodium 5 mM. L'homogénéisation a été réalisée avec un polytron à 11 000 tr/min de type PT-MR 2100. La mesure du pH a été réalisée sur l'homogénat avec un pH-mètre à microprocessor HANNA instruments HI 223.

L'iodoacétate de Sodium bloque l'activité des enzymes glycolytiques qui peuvent influencer la valeur du pH et comme il n'a pas d'effet tampon, le pH mesuré est égal au pH réel. .

I.3.3- Extraction des protéines myofibrillaires

Pour l'extraction des protéines myofibrillaires, nous avons utilisé le protocole mis en œuvre par Gagaoua *et al.* (2014). Le culot et le surnageant ont été obtenus à partir de 200 mg de muscle auxquels nous avons ajouté 2,5 ml de tampon d'extraction (NaCl 0,5 mM, Tris-HCl 50 mM EDTA 1 mM et DTT 1 mM à pH 6,8). L'incubation est réalisée dans de la glace pilée pendant 10 min. Nous avons homogénéisé au polytron pendant 15 à 20 sec. La tige du polytron a été rincée avec 2.5 ml de tampon d'extraction. La séparation des PMF a été effectuée par centrifugation de l'extrait à 4 000 rpm pendant 15 minutes à 4°C avec une centrifugeuse NF 400R. Le surnageant et le culot (auquel nous avons rajouté 500 µl de tampon d'extraction) ont été récupérés dans des tubes Eppendorf (**FIGURE 16**).

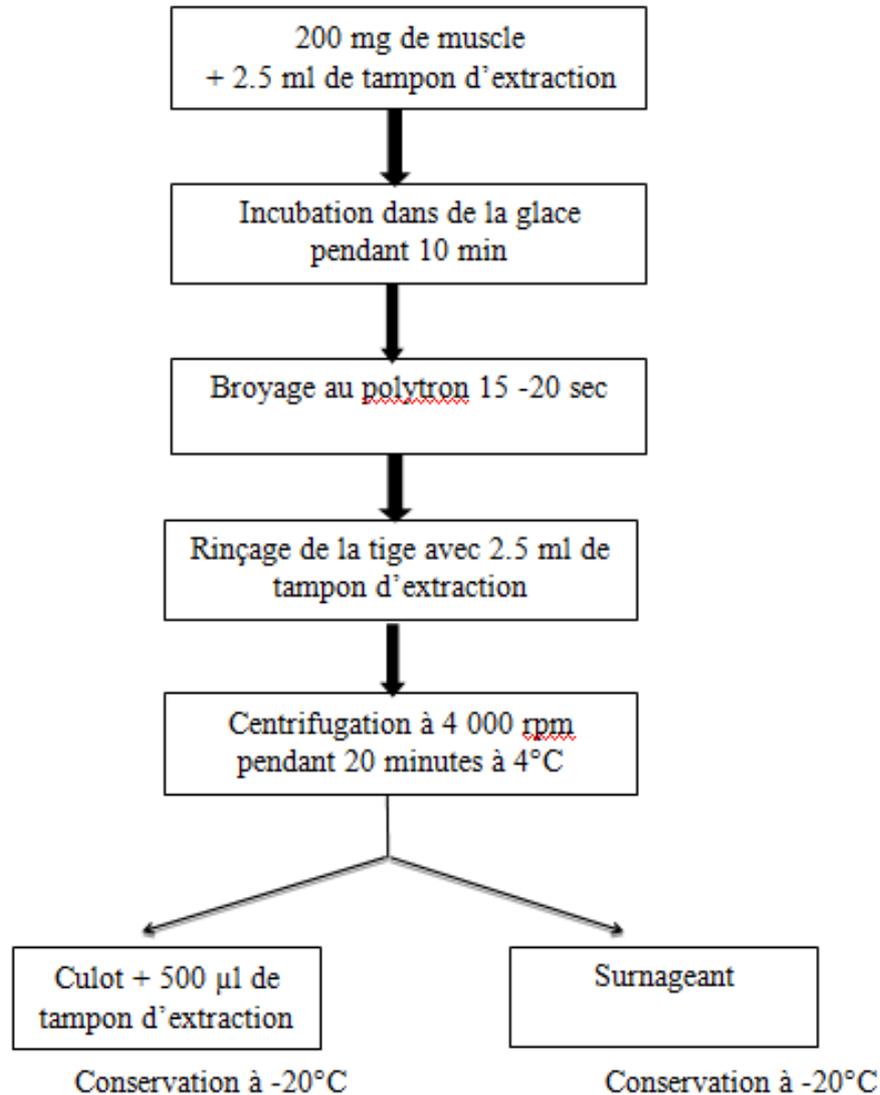


FIGURE 16 : Extraction des protéines myofibrillaires (Gagaoua *et al.*, 2014)

I.3.4- Dosage des protéines par la méthode Bradford

La concentration en protéines a été déterminée selon la méthode Bradford (1976) telle qu'exposée au paragraphe I.1.3. Nous avons utilisé une solution de BSA (1,33 mg/ml) comme standard. Le dosage consistait à ajouter 15 µl d'échantillon dilué dans 785 µl du tampon d'extraction additionné de 200 µl de réactif de Bradford. Après homogénéisation, le mélange a été placé 20 min à l'obscurité. Les concentrations de la gamme étalon étaient comprises entre 0 µg/ml et 25 µg/ml. Les mesures de l'absorbance ont été réalisées à 595 nm avec un spectrophotomètre SHIMADZU (UV-Visible 1800).

Après dosage, les protéines ont été dénaturées comme décrit dans le paragraphe I.1.4 en utilisant le même tampon de dénaturation et la même période de chauffage de 5 min. Les protéines dénaturées ont été conservées à une température de -20 °C jusqu'à utilisation.

I.3.5- Séparation des PMF par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Le gel de concentration (stacking) avec 7,5% d'acrylamide est caractérisé par une porosité supérieure engendrant peu d'effet de tamisage des protéines. Il a été placé au-dessus du gel de séparation (resolving) à 12% d'acrylamide. .

Après préparation des gels et du tampon de migration, les protéines extraites à différents temps *post mortem* ont été déposées à raison de 10 µg de protéines dans chaque puits. Il s'agissait de la concentration idéale pour une coloration au bleu de coomassie. Un puits a été réservé aux protéines de référence.

L'ensemble a été déposé dans la cuve d'électrophorèse remplie de tampon de migration. La migration a été réalisée d'abord à 80 V pour favoriser le tassement des protéines dans le gel de concentration pendant 30 min environ, puis à 130 V pendant 2 h dans le gel de séparation. Le gel de séparation permet de révéler les protéines selon leur poids moléculaire. Pour réaliser cette opération à température ambiante, le dispositif de migration a été couplé à un système de refroidissement à l'eau courante.

Pour chaque manipulation, trois gels ont été préparés avec les mêmes échantillons. Un gel coloré au bleu de Coomassie afin de révéler toutes les protéines séparées et deux autres gels non colorés ont été utilisés pour la révélation de la dégradation de l'actine et le relargage du cytochrome c par Westerns Blots.

I.3.6- Révélation de la dégradation d'actine et libération du cytochrome c par Western Blot

Les protéines séparées par SDS PAGE ont été transférées sur une feuille de polymère PVDF ayant subi les mêmes traitements décrits au paragraphe I.1.4.2 à la différence que l'anticorps primaire spécifique à la protéine d'intérêt était soit l'anti actine soit l'anticytochrome c.

Le profil densitométrique de la dégradation de l'actine et la libération mitochondriale du cytochrome c au cours du temps *post-mortem* avaient été réalisés avec le logiciel UN.SCAN.IT gel 6.1.

Chapitre II : ACTIVITE INHIBITRICE DES SERPINES A3 BOVINES

Dans cette partie nous exposons notre contribution à l'étude des propriétés des serpinines A3 bovines considérées comme régulateurs de l'apoptose et donc comme marqueurs pertinents de la tendreté de la viande.

Cet exposé concerne les différentes techniques d'étude des serpinines telles que présentées dans notre état de l'art (Boudida *et al*, 2016). Ces techniques concernent les étapes suivantes :

- 1- Purification ;
- 2- Caractérisation (Détermination du poids moléculaire (PM) par méthode électrophorétique, Western Blot, mesure des activités inhibitrices et caractérisation cinétique des inhibiteurs) ;
- 3- Analyse protéomique par électrophorèse bidimensionnelle ;
- 4- Identification par spectrométrie de masse (résultats fournis par la plateforme à notre demande).

II.1 - Purification

A- Matériel biologique

Le muscle *Diaphragma* de bovin (muscle rouge lent, métabolisme oxydatif), utilisé pour la préparation des inhibiteurs, a été prélevé immédiatement après l'abattage de l'animal et l'extraction a été effectuée sur le muscle encore chaud (1 h *post mortem*).

B- Matériel de chromatographie

Les supports et les colonnes pour système F.P.L.C (Fast Protein Liquid Chromatography) ayant été utilisés lors des étapes de chromatographie sont : Séphadex G-100 (gel filtration), SP-Sepharose, Q-Sepharose et Fractogel EMD-DEAE-650. Ces supports ont été obtenus chez Pharmacia.

C- Préparation de l'extrait du muscle

Le muscle *Diaphragma* de bovin a été utilisé pour l'extraction des inhibiteurs. Ce muscle est particulièrement riche en enzymes et inhibiteurs, et il peut être prélevé rapidement après l'abattage de l'animal. L'extrait brut a été préparé à partir de 450 g de muscle qui a été préalablement dégraissé et coupé en morceaux avant d'être haché à la moulinette (Moulinex). Les 450 g de muscle hachés ont été ensuite homogénéisés au polytron (type MR-2100 à vitesse maximale) dans 3 volumes de tampon Tris/HCl 50 mM, pH 7,6, KCl 150 mM, EDTA 4 mM.

L'homogénat a été soumis à deux étapes successives de centrifugation à faible vitesse (5 min à 1000g et 30 minutes à 2000g) permettant l'élimination des noyaux et des gros débris cellulaires. Le surnageant a subi une centrifugation à 20 000g pendant 30 min avec l'objectif d'éliminer les mitochondries, les lysosomes et autres débris membranaires de petite taille.

Le surnageant a été ensuite filtré sur de la gaze, ajusté à pH 10 avec de la soude 5 N, puis incubé à 38°C pendant 30 minutes. Le traitement thermique à pH alcalin a été destiné à dénaturer les enzymes présentes dans l'échantillon et à dissocier les complexes enzyme-inhibiteur existants. L'extrait brut a été ensuite ramené à pH 6 avec une solution d'HCl 5M, l'extrait brut a été à nouveau centrifugé 15 min à 20 000g ce qui permet l'élimination de nombreuses protéines contaminantes sans perte importante du pouvoir inhibiteur de l'extrait **(FIGURE 17)**.

Le pH du surnageant contenant les inhibiteurs a été ajusté à 7,6 avec une solution de NaOH 5N, puis concentré par précipitation au sulfate d'ammonium entre 40 et 70% de saturation, à 0°C dans la glace. Le précipité a été solubilisé dans environ 40 ml de tampon Tris/HCl 30 mM, pH 7,6, contenant 0,2 M NaCl puis dialysé à 4°C sous agitation pendant une nuit dans le même tampon afin d'éliminer le sulfate d'ammonium. La présence de sel permet de réduire l'interaction protéine-protéine, de dissocier les complexes protéiques et de minimiser les interactions avec le support chromatographique.

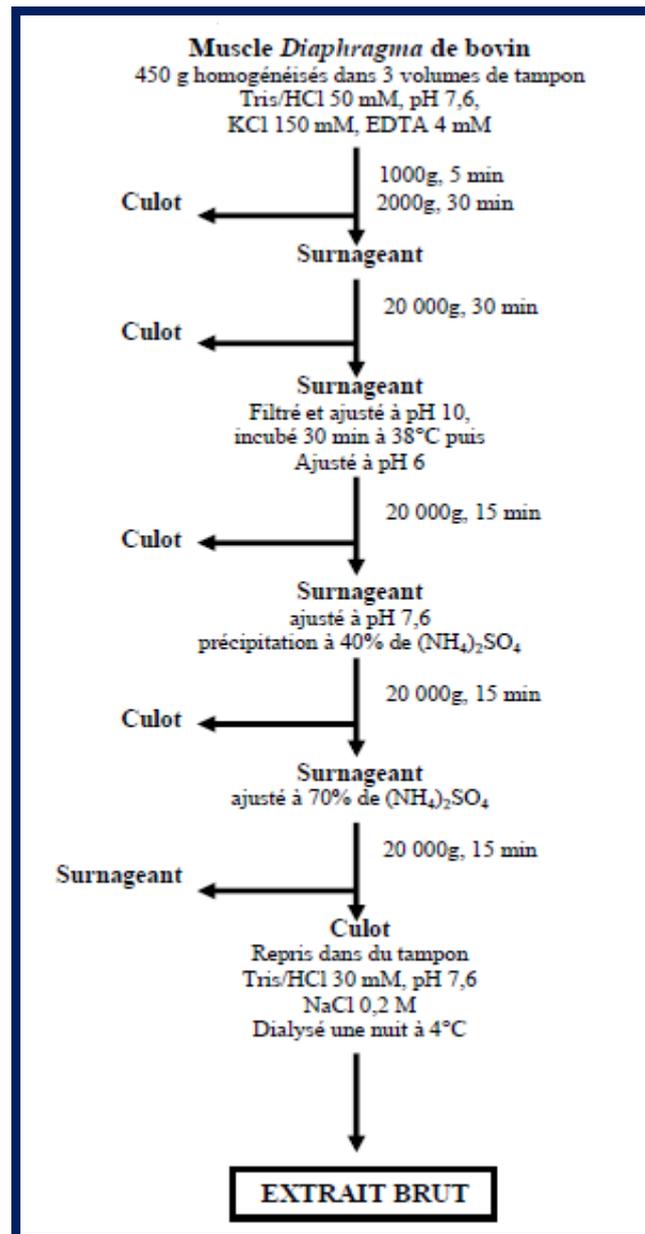


FIGURE 17 : Préparation de l'extrait brut à partir du muscle *Diaphragma* de bovin (Bige *et al.*, 1985)

D- Fractionnement ou purification proprement dite

L'extrait brut obtenu après dialyse a été centrifugé 15 minutes à 20 000g afin d'éliminer toutes les protéines ayant précipité à pH acide, protéines parmi lesquelles se trouvent de nombreux inhibiteurs de cystéine protéinases. Il a été ensuite filtré avec un filtre d'acétate de cellulose 0,2 μm et dégazé, avant d'être chromatographié sur un support de gel filtration.

D.1.Fractionnement des protéines selon leur masse moléculaire sur
Sephadex G-100

1. Préparation du gel

Le Sephadex est un gel constitué de particules sphériques mises en suspension dans un tampon. Les sphères sont composées de polymères de dextran et forment un réseau tridimensionnel constituant des pores qui vont plus ou moins retarder les protéines selon leur taille. Les groupements hydroxyles du gel lui confèrent un caractère hydrophile.

Les caractéristiques du Sephadex, type G-100, qualité superfine sont : diamètre des grains secs, 10-40 μm ; domaine de fractionnement, 4 000-100 000 Da ; gonflement de gel, 15-20 ml/g de poudre.

Ainsi, 150 g de gel ont été incorporés dans 3 litres de tampon Tris/HCl 30 mM, pH 7,6, NaCl 0,2 M sous agitation modérée constante. Après hydratation pendant 3 jours à température ambiante, le gel est dégazé afin d'éliminer les bulles d'air microscopiques qui pourraient perturber la migration des protéines. Le gel a été ensuite coulé à 4°C dans une colonne (5 x 100 cm) en une seule étape, afin de stabiliser le lit du gel, il est nécessaire d'éluer environ 2 fois le volume de la colonne avec du tampon d'équilibration lui-même dégazé.

2. Séparation de protéines

Un volume d'extrait protéique correspondant à 2-5% du volume total de la colonne peut être chargé, plus le volume de l'échantillon déposé sera faible, meilleure sera la séparation

L'échantillon a été chargé (40 ml, soit 2% du volume total de la colonne environ). Les protéines ont été éluées à un débit de 24 ml/h et des fractions de 10 ml sont collectées en sortie de la colonne. L'élution a été suivie par mesure de la densité optique à 280 nm. Par la suite chaque fraction a été testée pour son activité inhibitrice contre la trypsine.

D.2 Fractionnement des protéines selon leur charge électrique

La chromatographie échangeuse d'ions permet de séparer les protéines en fonction de leurs points isoélectriques. En travaillant à un pH fixe, les protéines vont devenir plus ou

moins anioniques ou cationiques. Puis, en jouant sur la teneur en sel, les protéines vont engendrer des interactions plus ou moins fortes qui conduisent soit à leurs rétentions, soit à leurs éluions.

Ainsi, les fractions inhibitrices obtenues précédemment et comportant des protéines de masse moléculaire élevée sont analysées par chromatographie d'échange d'ions.

Un échangeur d'ions est constitué d'une matrice insoluble sur laquelle sont fixés des groupements chargés (positivement dans le cas d'un échange d'anions et négativement dans le cas d'un échange de cations). Les protéines seront plus ou moins liées à la résine en fonction de leur charge globale.

Le décrochage séquentiel des protéines en fonction de leur charge a été réalisé par utilisation d'un gradient de force ionique.

Les deux types de chromatographie ont été utilisés.

Fractionnement par chromatographie échangeuse de cations S-Sepharose

La première fraction obtenue après gel filtration a été d'abord fractionnée par chromatographie d'échange de cations à pH 5,2 sur une matrice de S-Sepharose (groupement fixé : $-\text{CH}_2\text{-SO}_3^-$). La colonne (5 cm x 10 cm) a été équilibrée à un débit de 3 ml/min avec un tampon Acétate de Na/Acide acétique 50 mM, pH 5,2. Les protéines ont été éluées avec un gradient linéaire de NaCl (0-0,2 M) à un débit de 3 ml/min. Des fractions de 4,5 ml ont été collectées et testées pour leur activité inhibitrice contre la trypsine.

Fractionnement par chromatographie échangeuse d'anions Q-Sepharose

Deux types de supports ont été utilisés en raison de leurs capacités différentes à fixer certains contaminants. Le premier est le support Q-Sepharose dont le groupement actif est un ammonium quaternaire ($-\text{CH}_2\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$), tandis que le second le Fractogel EMD-DEAE comprend un ammonium secondaire.

Une chromatographie d'échange d'anions a été réalisée sur deux fractions inhibitrices. Les fractions inhibitrices obtenues en sortie de S-Sepharose ont été mises à dialyser le jour

même contre un tampon Tris/HCl 30 mM, pH 8,0, tampon d'équilibration de la colonne Q-Sepharose (2,5 cm x 10 cm), pendant une nuit sous agitation et à 4°C. L'élution a été réalisée en appliquant un gradient de NaCl entre 0 et 0,3 M, à un débit de 3 ml par min. Des Fractions de 4,5 ml ont été collectés et leur activité inhibitrice mesurée.

Fractionnement par chromatographie échangeuse de cations S-Sepharose

Une deuxième étape de chromatographie d'échange de cations a été réalisée. Une fraction inhibitrice obtenue en sortie de Q-Sepharose a été dialysée pendant une nuit contre un tampon Acétate de Na/Acide acétique 50 mM, pH 4,48, tampon d'équilibration de la colonne S-Sepharose (2,5 cm x 12 cm). Les protéines ont été éluées avec un gradient linéaire de NaCl (0-0,2 M) à un débit de 1 ml/min. Des fractions de 1,5 ml ont été collectées et leur activité inhibitrice contre la trypsine à été mesurée.

Fractionnement par chromatographie échangeuse d'anions Fractogel EMD-DEAE 650

C'est un groupement diéthyl-aminoéthyl qui permet de fixer de protéines. Les fractions inhibitrices obtenues (en sortie de la dernière S-Sepharose et de Q-Sepharose) ont été dialysées contre un tampon Bis/Tris/HCl 30 mM, pH 6, tampon d'équilibration de la colonne EMD-DEAE-650 (1 cm x 8 cm). L'élution a été réalisée en appliquant un gradient de NaCl entre 0 et 0,25 M, à un débit de 1 ml par min. Des Fractions de 2 ml ont été collectées et leur activité inhibitrice a été mesurée.

II.2- CARACTERISATION DES INHIBITEURS

II.2.1- Dosage des protéines

Le dosage des protéines (des inhibiteurs) a été effectué par la méthode de Bradford (1976) qui a été déjà décrite dans le premier chapitre paragraphe I.1.3. Les protéines ont été dosées sur deux gammes de concentration (de 0 à 25 µg/ml et de 0 à 1,3 mg/ml).

II.2.2- Détermination du poids moléculaire par méthode électrophorétique

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) est une méthode de routine employée dans le domaine de l'analyse protéomique pour la séparation des protéines car elle demeure une technique robuste et reproductible (Garfin, 2003).

L'analyse électrophorétique des échantillons des différentes fractions contenant les inhibiteurs, en conditions dénaturantes, est effectuée en présence de SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) (3%) un agent tensioactif et de 2-mercaptoéthanol (1%) sur des gels d'acrylamide à 10% (bis-acrylamide 0,8% ou 0,4%) ou à 12,5% (bis-acrylamide 0,8%) selon la méthode décrite par Laemmli (1970) pour la SDS-PAGE.

Le SDS, en solubilisant les protéines (1,4 g de SDS par gramme de protéines) et en leur conférant une charge négative identique, permet la séparation des protéines uniquement sur la base de leur poids moléculaire. Leur vitesse de migration sera donc fonction de la taille des protéines et de la taille des mailles du gel. Le 2-mercaptoéthanol est un agent réducteur des ponts disulfures et permet de mettre en évidence les différentes sous-unités d'une protéine. Elles vont donc être séparées suivant leurs poids moléculaires : les protéines de fortes tailles auront des difficultés à traverser les mailles du gel d'acrylamide.

Cette méthode permet donc de déterminer la masse moléculaire de protéines inconnues en comparant leur déplacement à celui de protéines connues (marqueurs). Les marqueurs de poids moléculaire utilisés sont : la phosphorylase b (94 kDa), la sérum albumine bovine (67 kDa), l'ovalbumine (43 kDa), l'anhydrase carbonique (30 kDa), l'inhibiteur trypsique du soja (20 kDa) et l' α -lactalbumine (14 kDa). Nous avons aussi utilisé des marqueurs prémarqués ; il s'agit de protéines recombinantes pré-marquées au bleu provenant de chez Bio-Rad (#161-0373), permettant d'estimer de haut en bas la distance de migration et qui ont un poids moléculaire par ordre décroissant comme suit (kDa) : 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 et 10. Pour mettre en évidence les protéines, les deux colorations (bleu de coomassie et nitrate d'argent) ont été utilisées. La coloration au nitrate d'argent a été parfois choisie lorsque la quantité de protéines déposées dans les puits était faible ou pour vérifier la pureté de la préparation d'une part et pour exciser les bandes pour la spectrométrie de masse.

II.2.3- Caractérisation par western blot

Après avoir confirmé la présence des spots protéiques dans le gel de 2DE, l'autre gel a été gardé pour la caractérisation (révélation) par western blot selon le protocole décrit par Sentandreu *et al.* (2003) détaillée dans la chapitre I.

La technique du western blot a été utilisée pour détecter la présence de la SERPIN A 3 et les différents isoformes de cet inhibiteur dans les échantillons des fractions chromatographiques à l'aide d'un anticorps polyclonal ayant 75 % d'identité contre la SERPIN A 3 bovine.

L'anticorps primaire utilisé était l'anti-SERPINA3 dilué 1/500^{ème} et l'anticorps secondaire était commercial de chèvre anti-immunoglobulines de lapin et conjugué à la phosphatase alcaline de chez Jackson ImmunoResearch dilué au 1/2000^{ème}.

II.2.4- Mesure des activités inhibitrices

A- Matériels de spectrométrie pour la titration et la lecture des activités

Deux différents types de spectrofluorimètre ont été utilisés : un spectrofluorimètre Perkin Elmer type LS-5, et un autre de chez Bio-Tek Instruments type FLx800 Microplate Fluorescence Reader. On a aussi utilisé un spectrophotomètre U-2001 (Hitachi) pour la mesure des absorbances.

B- Enzymes, substrats et inhibiteurs

Les enzymes, substrats et inhibiteurs utilisées dans notre étude sont :

- **Les enzymes** : trypsine pancréatique bovine (EC 3.4.21.4), chymotrypsine du plasma bovin (EC 3.4.21.1), et caspase 3 (EC 3.4.22.B9) proviennent de chez Sigma.
- **Les substrats et inhibiteurs** : *N*-CBZ-Phe-Arg-NHMec, MeO-Ala-Ala-Pro-Phe-NHMec, *N*-MethylSuc-Ala-Ala-Pro-Val-NHMec de chez Sigma pour la trypsine, la chymotrypsine et la caspase 3 respectivement (où CBZ,

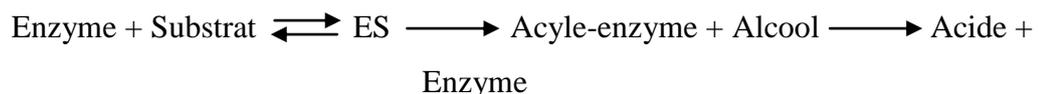
benzyloxycarbonyl ; NHMec, 7-amido-4-méthylcoumarin; Suc, succinyl ; MeO, methoxy), et leur inhibiteurs synthétiques respectifs : 4-Nitrophenyl-p-guanidinobenzoate ou p-NPGB (de chez Sigma), Z-Gly-Gly-Phe-CMK et Z-Asp-Glu-Val-Asp-CMK (de chez Bachem) (où CMK, chloromethylketone).

C- Préparation des enzymes

La trypsine a été préparée dans une solution d'HCl à 1mM, puis aliquotée dans des Ependorff de 1 ml et conservés à -80°C . La chymotrypsine a été préparée dans un tampon Tris/HCl 50 mM, pH 8.0, CaCl_2 10 mM à une concentration de 100 μM . Enfin la caspases 3 ($10 \cdot 10^{-9}$ M) a été préparée dans un tampon HEPES 50 mM, pH 7.4, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, CHAPS 0,1 %, saccharose 10 % auquel sont ajoutés 10 mM de DTT au moment de son utilisation.

D- Titration des enzymes

La trypsine qui est une endoprotéase hydrolysant les liaisons peptidiques en position C-terminale dans lesquelles un acide aminé basique, la Lys (K) ou Arg (R), engage sa fonction acide, est titrée en utilisant du 4-Nitrophényl-p-guanidinobenzoate (p-NPGB) selon la méthode décrite par Chase et Shaw (1970). Les serine protéinases sont particulièrement faciles à doser car elles ont l'avantage de former, lors du processus catalytique, un intermédiaire nommé acyle-enzyme. Cet acyle-enzyme est ensuite hydrolysé en acide et enzyme. Si cette hydrolyse est très lente, l'alcool libéré lors de la formation de l'acyle-enzyme est équivalent au nombre de moles d'enzyme active que l'on peut déduire en mesurant l'absorbance de l'alcool chromogénique formé.



Le substrat de la trypsine utilisé est le p-NPGB de chez Sigma. Ce substrat est choisi préférentiellement car l'acyle-enzyme formée lors du processus catalytique est particulièrement stable.

Dans une microcuve de 1 cm de trajet optique, 100 µl d'une solution de trypsine, préparée à raison de 1mg/1ml à l'aide d'un tampon HCl 1mM, sont dilués avec 890 µl de tampon d'incubation (Tris-HCl, 50mM), pH 8.5, après mélange 10µl de la solution de p-NPGB sont ajoutés dans la microcuve. Le p-NPGB réagit avec la trypsine et l'alcool formé, le p-nitrophénol, donne à la solution une coloration jaunâtre visible à l'œil, dont l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 410 nm à l'aide du spectrophotomètre U2001 (Hitachi). Une autre mesure témoin est réalisée en même temps avec une autre microcuve contenant 100 µl de tampon sans trypsine, 890 µl du tampon d'incubation et 10µl du substrat (p-NPGB).

La molarité du p-nitrophénol généré peut être calculée selon la formule :

$$[\text{p-Nitrophénol}] = \text{DO} \times 6,025.10^{-5} \times 10$$

Où la DO représente la densité optique du p-nitrophénol libéré, $6,025.10^{-5}$ le coefficient d'extinction molaire du p-nitrophénol, et 10 le facteur de dilution de la trypsine. La molarité du p-nitrophénol produit permet de déduire la molarité de la trypsine active.

La caspase 3 est une protéase à cystéine, qui clive son substrat cible du côté C-terminal d'un résidu Asp (D) présent dans un site de reconnaissance spécifique. Dans le cas de la caspase 3 humaine, ce site correspond au motif DEVDX ou DMQDX avec X correspondant à n'importe quel acide aminé en dehors de la proline. La caspase 3 liquide stockée à -80°C (EC 3.4.22.B9) provenant de chez sigma est titrée avec l'inhibiteur commercial irréversible Z-Asp-Glu-Val-Asp-CMK (Z-DEVD-CMK) de chez Bachem. La titration est réalisée selon la méthode de Stennicke et Salvesen (1999), l'enzyme est reprise au préalable dans le tampon d'incubation : HEPES 50 mM, pH 7.4, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, CHAPS 0,1%, saccharose 10 %, auquel sont ajoutés 10 mM de DTT au moment de son utilisation.

La concentration de la caspase 3 est de 0,29 mg/ml, elle a été diluée 10 fois dans le tampon d'incubation, donc sa molarité est de $8,16.10^{-7}$ M. Une solution de 5 nM de la caspase3 est titrée avec une gamme de dilution de l'inhibiteur (Z-DEVD-CMK) (figure XX=19) allant de 0 à 50 µM qui est estimée après une pré-incubation de 5 minutes à 25°C , ou

50 µl du substrat N-Acétyl-Asp-Glu-Val-Asp-NHmec de chez sigma à 100 µM est ajouté. La fluorescence est lue pendant 5 à 10 minutes à l'aide du spectrofluorimètre Bio-Tek type FLx800 ou celui du Perkin Elmer type LS-5 à une longueur d'onde d'excitation de $\lambda = 360$ nm et d'émission de $\lambda = 440$ nm. Le calcul de la concentration de l'enzyme active dans la solution est déterminé par la formule :

$$[E]_{\text{active}} = [I] (V_I/V_E) \times \text{facteur de dilution}$$

Où :

$[E]_{\text{active}}$: concentration réelle de l'enzyme active (en nM) ;

$[I]$: concentration de l'inhibiteur (pour notre exemple nous avons 9,06 nM) ;

V_I : volume de 20µl des différentes dilutions de l'inhibiteur ;

V_E : volume de l'enzyme de 30 µl ($[E] = 5$ nM) ;

La chymotrypsine (EC 3.4.21.1) est une protéase digestive, de la famille des serine protéases, qui peut accomplir la protéolyse. Elle catalyse l'hydrolyse du lien peptidique d'une protéine, coupant préférentiellement sur le côté C-terminal des acides aminés à longues chaînes latérales aromatiques et hydrophobes : de la Tyr, du Trp, de la Phe. Ces acides aminés non-polaires créent une poche hydrophobe nécessaire à l'activité enzymatique. Elle a été titrée en utilisant l'inhibiteur irréversible Z-Gly-Gly-Phe-CMK (où CMK = Chloromethylketone) (Wilcox *et al.*, 1971). Une quantité de 3,4 mg de l'enzyme lyophilisée est reconstituée dans 1360 µl du tampon de reconstitution Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, CaCl₂ 10 mM, pour avoir une concentration finale de 100 µM.

E- Mesure des activités enzymatiques

Les activités des différentes enzymes ont été mesurées en suivant l'hydrolyse d'un substrat synthétique fluorescent à l'aide des spectrofluorimètres Perkin Elmer LS-50B (pour la trypsine, la chymotrypsine, l'élastase et la caspase 3) et Bio-Tek's FLx800 Microplate Fluorescence Reader (pour la caspase 3 uniquement) étalonnés au préalable avec des solutions de 0,1 et 0,5 µM du -NH₂Mec (7-amido-4-méthylcoumarin). La fluorescence du -NH₂Mec libérée après hydrolyse du substrat de l'enzyme, a été mesurée à une longueur d'onde

d'excitation de 360 nm et une longueur d'onde d'émission de 440 nm à des largeurs de fente de 8 ou 15 nm. Le pas de longueur d'onde était de 0,5 nm et la durée d'acquisition du signal était de 1 seconde pour chaque puits.

L'activité de la trypsine a été mesurée selon Tassy et al. (2005) en utilisant N-CBZ-Phe-Arg-NHMec comme substrat. En ce qui concerne la chymotrypsine, le substrat utilisé est le Meo-Ala-Ala-Pro-Phe-NHMec (Barret, 1980). Les activités de la caspase 3 ont été mesurées selon Stennicke et Salvesen (1999) en utilisant comme substrat le N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-NHMec.

Les substrats de la chymotrypsine, l'élastase et la caspase 3 ont été reconstitués en solutions stock dans du DMSO (diméthylsulfoxyde) à une concentration finale de 10 mM, et sont conservés à température ambiante à l'abri de la lumière. Quant au p-NPGB, le substrat spécifique de la trypsine, il a été reconstitué dans du DMF (diméthylformamide) à une concentration finale de 50 mM et la solution obtenue, pour être plus stable, est diluée dans 4 volumes d'acétonitrile à une concentration finale de 10 mM. La solution du p-NPGB ainsi préparée peut être conservée plusieurs semaines à 4°C.

Les différents tampons d'incubation adéquats utilisés pour les différentes enzymes étudiées sont comme suit :

- Pour la trypsine : Tampon Tris/HCl 50 mM, pH 8.5 stocké à 4 °C;
- Pour la chymotrypsine : Tampon Tris/HCl 50 mM, pH 8.0, CaCl₂ 10 mM stocké à 4 °C ;
- Pour la caspase 3 : Tampon HEPES 50 mM, pH 7.4, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, CHAPS 0,1%, saccharose 10% auquel sont ajoutés 10 mM de DTT extemporanément.

Ainsi, 40 µl de la solution d'enzyme (5nM) ont été incubés dans une microplaque de 96 puits à 37°C en présence de 50 µl du substrat spécifique (10 mM dans du DMSO) diluée 33 fois [100 µM] dans du Brij 35 à 0.1%, et complété avec le tampon d'incubation adéquat à un volume final de 150 à 160 µl, pendant 15 min pour la trypsine, la chymotrypsine et l'élastase avant d'effectuer la lecture. Une unité d'activité enzymatique correspond à 1 µM de N-Mec libéré par minute à 37 °C.

En ce qui concerne la caspase 3, 30 µl de l'enzyme (8,16.10⁻⁷ M) ont été incubés à 25°C pendant 5 min avec 50 µl du substrat (N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-NHMec, 100 µM). Une unité d'activité enzymatique correspond à 1 µM de N-Mec libéré par min à 25 °C.

F- Mesure des activités inhibitrices

Les activités inhibitrices déterminées en sortie de colonne, ont été mesurées dans les mêmes conditions que celles décrites pour la mesure des activités enzymatiques, après préincubation pendant 20 minutes à 37°C de 30 µl de chaque fraction à tester avec 750 µl de trypsine (utilisée comme enzyme modèle) à une concentration de l'ordre du nanomolaire.

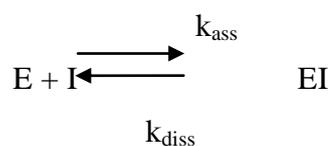
La réaction enzymatique a été ensuite initiée par addition de 250 µl de N-CBZ-Phe-Arg-NHMec. L'activité inhibitrice a été ensuite exprimée en pourcentage de perte d'activité de l'enzyme par rapport à un témoin incubé dans les mêmes conditions, mais dans lequel les 30 µl de solution à tester ont été remplacés par 30 µl de tampon.

II.2.5- CARACTERISATION CINETIQUE DES INHIBITEURS

L'inhibition des enzymes protéolytiques par des inhibiteurs protéiques endogènes spécifiques implique une interaction forte entre deux protéines. Dans le cas de l'inhibition des protéases par des inhibiteurs protéiques, l'affinité de l'inhibiteur pour l'enzyme est élevée, de l'ordre du nanomolaire, et la concentration de l'inhibiteur est fortement diminuée après la formation du complexe enzyme-inhibiteur. On peut distinguer trois types d'inhibition : inhibition réversible, irréversible et inhibition temporaire.

- *Inhibition réversible*

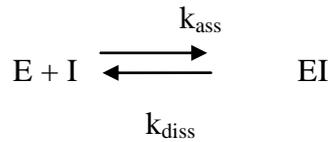
Une inhibition réversible est caractérisée par un équilibre rapidement atteint entre l'inhibiteur et l'enzyme. La protéase E réagit avec l'inhibiteur I pour former un complexe EI selon l'équation :



Où k_{ass} représente la constante d'association du complexe et k_{diss} la constante de dissociation du complexe. La constante d'équilibre du complexe ou d'inhibition est reliée à ces deux constantes par la relation :

$$K_i = k_{\text{diss}} / k_{\text{ass}} \quad (2)$$

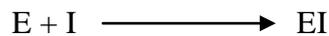
Les constantes d'association, de dissociation et d'inhibition ont une signification complexe. Néanmoins, ces constantes cinétiques sont suffisantes pour expliquer le rôle physiologique de l'inhibiteur (Bieth, 1980).



- ***Inhibition irréversible***

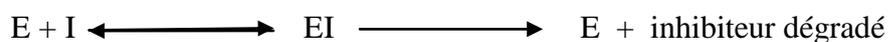
Le terme d'irréversibilité n'est pas correct d'un point de vue thermodynamique. Dans l'inhibition irréversible, le complexe enzyme-inhibiteur ne se dissocie pas dans des limites de temps raisonnables. Deux cas de figures sont alors possibles : soit l'inhibiteur est réversible mais la constante de dissociation (k_{diss}) est très faible, soit la formation du complexe enzyme-inhibiteur s'accompagne d'une hydrolyse partielle de l'inhibiteur. Celui-ci devient alors inactif après la réaction.

Dans ce cas, la réaction suivante se produit :



- ***Inhibition temporaire***

L'inhibition est dite temporaire lorsque l'enzyme se libère totalement du complexe sous forme active. Cette réaction conduit à l'hydrolyse partielle de l'inhibiteur ou relargage de l'enzyme. La libération des produits d'hydrolyse, plus ou moins rapide, constitue un élément clé dans la détermination de la valeur de la constante globale. C'est ce que l'on appelle l'inhibition temporaire qui est définie par la réaction :



II.2.5.1- Détermination de la constante de vitesse d'association (k_{ass})

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

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

Par contre dans le cas d'une inhibition irréversible, la constante de dissociation k_{diss} , est particulièrement lente, et peut donc être négligée. L'équation devient alors :

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

Si la valeur de k_{diss} est suffisamment faible, l'équation peut être utilisée pour décrire une inhibition réversible, au moins pendant les premières étapes du processus d'inhibition.

Lorsque l'association enzyme-inhibiteur est suffisamment rapide, on peut déterminer la constante d'association en incubant des quantités équimolaires d'enzyme et d'inhibiteur.

Pour la trypsine, Nous avons utilisé la méthode décrite par Beatty *et al.* (1980) basée sur des conditions de pseudo premier ordre selon l'équation suivante :

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

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

En pratique, des concentrations équivalentes en trypsine et inhibiteur purifié (5 nM) ont été préincubées dans le tampon d'incubation Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 8,0 dans un volume réactionnel final de 100 μ l pendant une durée allant de 0 à 25 minutes. Le substrat N-CBZ-Phe-Arg-NHMec a été ensuite ajouté (50 μ l à 100 μ M) puis l'activité résiduelle a été mesurée.

Dans le cas de la caspase-3, la constante d'association a été déterminée par la méthode de courbes décrite par Zhou *et al.* (1997).

Le principe est que la solution de la protéinase est ajoutée à la solution du substrat approprié. Ce mélange permet le calcul de v_o (vitesse d'hydrolyse du substrat en l'absence d'inhibiteur). Quand une vitesse constante est obtenue, l'inhibiteur est ajoutée au mélange et l'incidence sur la vitesse de la réaction est mesurée (k_{obs}) jusqu'à ce que la vitesse v_i (vitesse d'hydrolyse du substrat en présence d'inhibiteur) soit établie.

En pratique, une solution à 2 ou 5 nM de caspase-3 (dans un volume de 30 μ l) a été incubée en présence de 50 μ l de substrat approprié (N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-NHMec, à 100 μ M) dans un tampon d'incubation HEPES 50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, CHAPS 0,1 %, sucrose 10 % auquel sont ajoutés 10 mM de DTT au moment de son utilisation. La mesure de la fluorescence a été alors faite. Quand une vitesse constante a été obtenue, une concentration d'inhibiteur (de 1 à 50 nM dans un volume de 20 μ l) a été ajoutée au mélange et la fluorescence a été mesurée pendant 20 min au minimum.

Pour chaque concentration d'inhibiteur, la constante de premier ordre k_{obs} est déterminée par l'équation :

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

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

La représentation graphique de la concentration en inhibiteur en fonction des différentes valeurs de k_{obs} obtenues permet d'obtenir une droite dont la pente est k'_{obs} .

La constante de vitesse de deuxième ordre (k_{ass}) est alors déterminée par la relation suivante :

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

II.2.5.2- Réalisation des courbes d'inhibition avec les peptidases à sérine et cystéine

L'inhibition des différentes enzymes protéolytiques par les inhibiteurs protéiques spécifiques implique une interaction forte entre deux protéines. Dans le cas de l'inhibition des protéases par des inhibiteurs protéiques, l'affinité (spécificité) de l'inhibiteur pour l'enzyme

est élevée, de l'ordre du nanomolaire, et la concentration de l'inhibiteur est fortement diminuée après la formation du complexe enzyme-inhibiteur. On peut distinguer ainsi trois types d'inhibition : inhibition réversible, irréversible et inhibition temporaire.

II.3- Analyse protéomique par électrophorèse bidimensionnelle (2-DE)

L'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE) est une méthode très résolutive et reproductible notamment pour de nombreuses études faisant appel à l'extraction et la solubilisation des protéines (O'Farrell, 1975). La 2D-PAGE repose sur la combinaison de deux électrophorèses sur gel successives, présentant l'avantage d'être des séparations selon deux paramètres indépendants et d'avoir une haute résolution. Ainsi, selon la première dimension, les protéines sont séparées selon leur point isoélectrique par focalisation isoélectrique. Selon la seconde dimension, elles sont séparées suivant leur masse par PAGE au SDS (**FIGURE 18**).

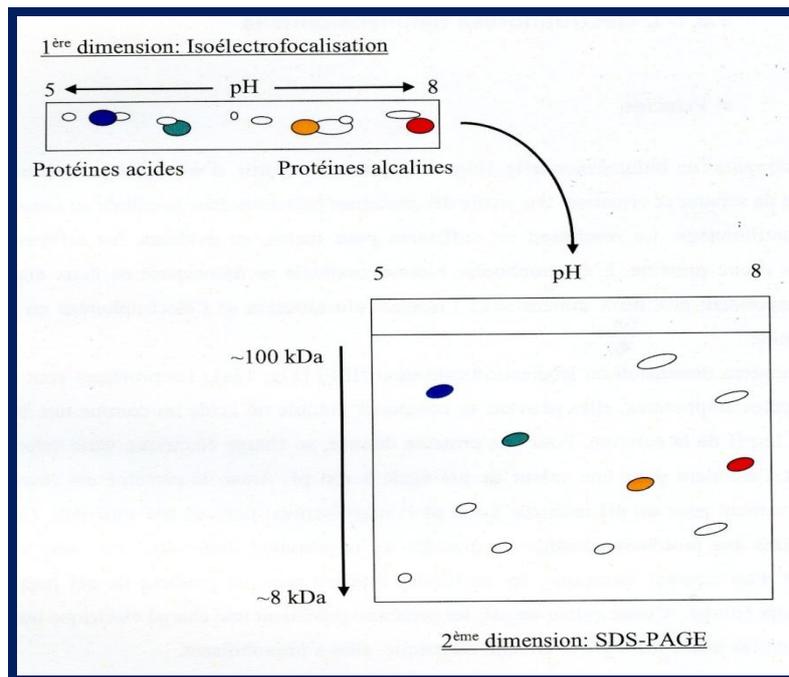


FIGURE 18 : principe de l'électrophorèse bidimensionnelle

Le pré-requis pour réaliser de bonnes analyses par 2-DE reste une préparation optimisée des échantillons ainsi que de différentes solutions utiles à la réalisation des électrophorèses. Ceci permet également de séparer une quantité importante en protéines (2 à 5 mg de protéines), favorisant ainsi l'étude de protéines faiblement représentées.

Les gels de 2-DE permettent de visualiser entre 100 et 3000 spots protéiques selon les échantillons et les méthodes de révélation employées. La reproductibilité technique de séparation des protéines par 2-DE est bien maîtrisée, facilitant la localisation précise des spots protéiques.

Une étape essentielle pour réaliser des études différentielles de composition en protéines est l'analyse des images résultantes de la visualisation des protéines sur les gels de 2-DE. Son but est de quantifier, de manière relative, le niveau d'expression des protéines. Pour cela, l'analyse se décompose généralement en quatre étapes : la détection des spots protéiques, le « matching », la suppression du bruit de fond et la normalisation. Par la suite, le traitement statistique des données permet de déterminer quelles sont les protéines significativement différentiellement exprimées entre deux échantillons. Leur identification par spectrométrie de masse permet d'interpréter biologiquement les variations d'expression de protéines observées.

- Première dimension

La première dimension en 2-DE est la focalisation isoélectrique (IEF, *isoelectric focusing*). Dans la première dimension, les protéines ont été séparées en fonction de leur point isoélectrique (pI) dans des bandes de gels à gradient de pH immobilisé ou « IPG strips » (*immobilized pH gradient strips*) établi par des ampholytes. Ainsi, sous l'effet d'un champ électrique constant, les protéines migrent dans un gel d'acrylamide jusqu'au point où leur charge est nulle, c'est-à-dire où le pH du gel correspond à leur pI. Les protéines vont ainsi arrêter leur migration et seront donc séparées selon leur point isoélectrique (FIGURE 18).

La focalisation se fait sur une bandelette en matière plastique sur laquelle a été coulé un gel polyacrylamide à 3% à gradient de pH immobilisé. Ce gel se présente sous forme déshydraté. L'étape de réhydratation se fait par contact direct avec l'échantillon. La faible concentration du gel permet l'entrée des protéines pendant la réhydratation et évite de séparer les protéines selon leur poids moléculaire durant l'IEF. Les IPG strips commerciaux permettent d'obtenir une meilleure reproductibilité entre IEF. Nous avons optés aux IPG strips de 0,5 x 7 cm possédant un gradient (gamme) de pH de 4,0 à 7,0.commercialisés par Bio-Rad.

a) Réhydratation

Un échantillon de 6-9 µg de protéines ont été chargés par bandelette. Les volumes correspondants sont dilués dans un tampon de réhydratation (urée 7 M, thiourée 2%, CHAPS 2%, DTT 0,2%, ampholytes pH 4-7 2%, 0,0002% bleu de bromophénol, Pefabloc 5 mM).

Les bandelettes ont été placées dans les rigoles de l'IEF-CELL (Bio-Rad) contenant les échantillons puis ont été recouvertes d'huile minérale. Les gels ont été réhydratés de manière passive (20°C, 0 V) pendant une nuit.

b) Focalisation

Le programme de focalisation était le suivant :

- 50 V (→ constante) pendant 2 h ;
- 100 V (→) jusqu'à atteindre 200 V.h ;
- 500 V (→) pendant 1 h ;
- 1000 V (↑ rapide) pendant 2 h ;
- 10 000 V (↑) pendant 6 h ;
- et enfin 10 000 V (→) jusqu'à atteindre 40 000 V.h.

A la fin de cette étape, les bandelettes ont été stockées à - 20°C jusqu'à leur prochaine utilisation pour la deuxième dimension.

- Deuxième dimension

Suite à l'IEF, il est possible de séparer les différentes protéines selon une seconde dimension par électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide (2D-PAGE).

b) Equilibration

Les bandelettes ont été équilibrées dans deux tampons d'équilibration (Giometti *et al.*, 2003) successifs :

- ✓ **Tampon 1** : urée 6 M, SDS 2%, glycérol 30%, Tris 50 mM, pH 8.8, DTT 1%.
Incubation pendant 15 minutes sous agitation ;

-
- ✓ **Tampon 2** : urée 6 M, SDS 2%, glycérol 30%, Tris 50 mM, pH 8.8, iodoacétamide 2,5% et une pincée ou quelques grains de bleu de bromophénol. Incubation pendant 20 minutes sous agitation.

Cette phase permet de conférer une charge globale négative aux protéines grâce au SDS afin de les séparer uniquement selon leur poids moléculaire lors de la deuxième dimension. Elle permet également de rompre les ponts disulfures grâce au DTT et d'empêcher leur conformation en alkylant les résidus soufrés par l'iodoacétamide pour aider le transfert des protéines d'un gel à l'autre.

c) SDS/PAGE

Après équilibration, les bandelettes ont été déposées au dessus du gel de deuxième dimension (gel à 12%, rapport acrylamide/bisacrylamide : 37,5 :1). Deux bandelettes ont été déposées par gel, une à chaque extrémité. Une solution d'agarose à 0,5 % a été déposée pour assurer le contact entre les deux gels et immobiliser la bandelette. Les gels ont été placés dans la cuve d'électrophorèse *Multi Gels Electrophoresis Units* (Bio-Rad). La migration a été réalisée par la suite en deux étapes :

- ✓ Une première étape de migration s'est déroulée pendant 1 heure sous 40 V à ampérage constant de 15 mA/gel ;
- ✓ Puis une deuxième étape d'environ 17 heures à 110 V et 15 mA/gel permettant la séparation des protéines.

d) Coloration au nitrate d'argent

Pour mieux détecter l'ensemble des spots protéiques présents dans le gel de 2DE, il est recommandé de le colorer au nitrate d'argent. Pour cela, le protocole de Yan *et al.* (2000) déjà cité dans le chapitre I a été utilisé. Après trois lavages successifs de 5 min dans de l'eau milli-Q, les gels ont été finalement scannés pour l'analyse comparative par analyse d'image (logiciel PDQuest de Bio-Rad).

II.4- Identification par spectrométrie de masse

A la suite de l'analyse des gels mono ou bidimensionnels, les spots ou les bandes d'intérêt ont été identifiés.

La protéine à identifier a subi tout d'abord un traitement à la trypsine (**FIGURES 19 et 20**). Cette endoprotéase hydrolyse les liaisons peptidiques en C-terminal des acides aminés basiques (Lysine, Arginine). 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.

La désorption-ionisation laser assistée par matrice (en anglais : *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation* ou 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/charge. L'enchaînement des acides aminés d'un peptide peut être également obtenu par études de spectrométrie de la masse en tandem (MS/MS). Le protocole détaillé ci-dessous est fourni et utilisé par la Plateforme d'Exploration du Métabolisme de l'INRA de Clermont – Theix.

II.4.1- Empreinte peptidique massique (EPM) par MALDI-TOF

Les spots ou les bandes protéiques à identifier sont prélevées sur un gel d'électrophorèse coloré au bleu de Coomassie ou au nitrate d'argent. Ils sont décolorés et déshydratés. La protéine est ensuite hydrolysée en peptides par la trypsine. Le mélange peptidique obtenu est déposé sur une cible en présence de matrice puis il est analysé par MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*) – TOF (*Time of Flight*). C'est une technique d'ionisation dite douce puisque elle génère des ions moléculaires relativement

stables. La deuxième étape consiste en la mesure du temps de vol (de l'ordre des nanosecondes) des ions formés dans un tube de vol dans lequel est réalisé un vide poussé (10^{-7} millibare). Cette méthode permet d'analyser une large gamme de masse (0,5 à 300 kDa), l'acquisition des données est rapide (**FIGURES 19 et 20**).

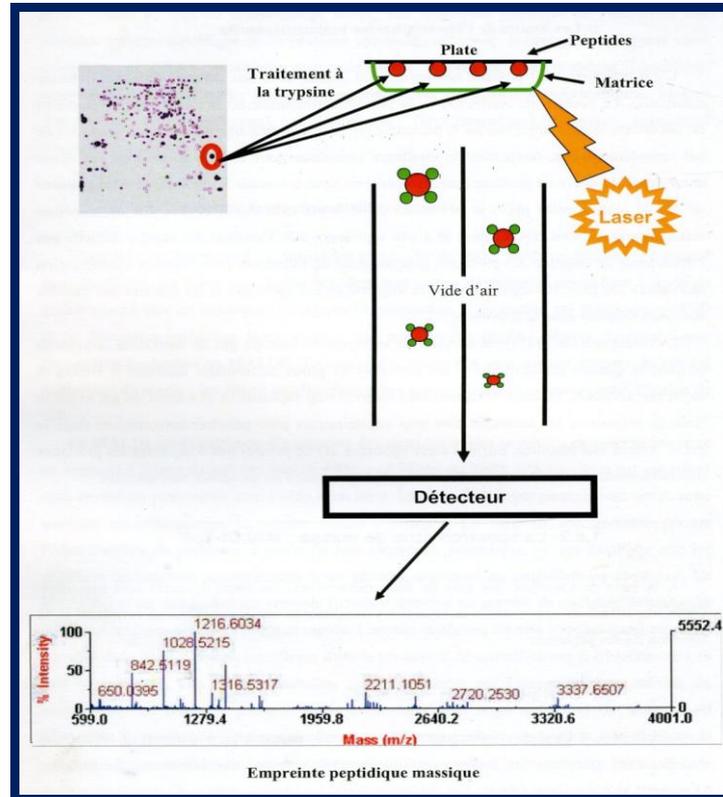


FIGURE 19 : Principe de la spectrométrie de masse

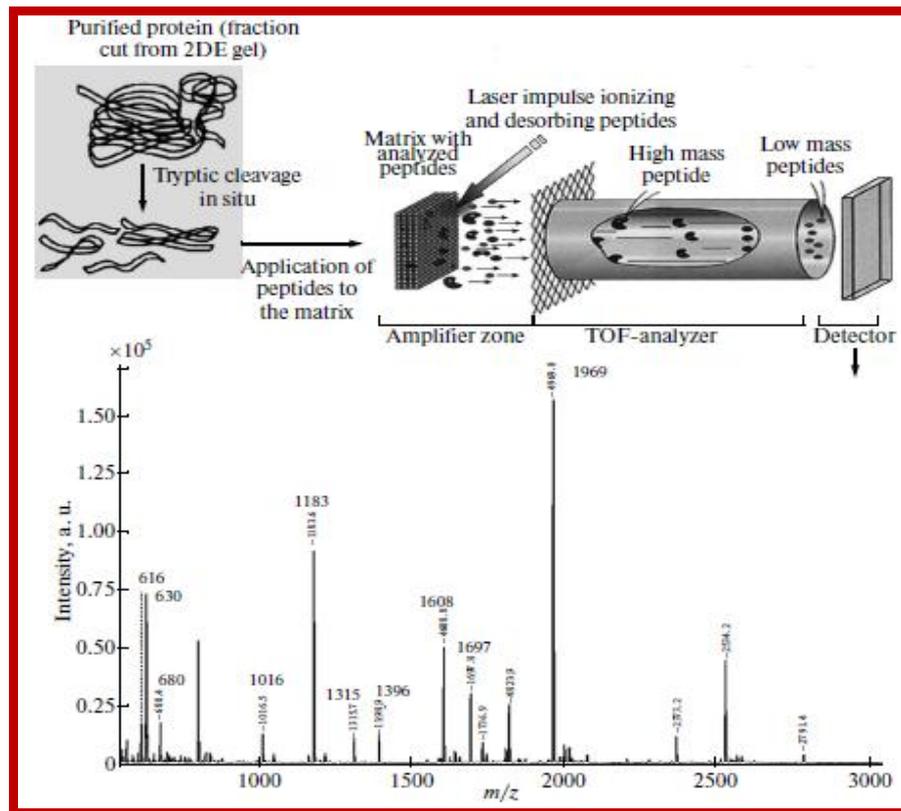


FIGURE 20 : Spectrométrie de masse MALDI-ToF (Shishkin *et al.*, 2014)

A- Préparation des bandes

A.1- Prélèvement des bandes ou spots : les bandes ou spots d'intérêt sont soigneusement (environnement sans poussières ni empreintes de doigts) excisés. Avant de les exciser du gel d'acrylamide, il est nécessaire de bien rincer le gel à l'eau distillée. Les bandes ou spots ont été excisés à l'aide d'un scalpel stérile (faire l'excision le plus près du spot pour éviter le bruit de fond). Les échantillons ont été ensuite placés dans des tubes eppendorf de 0,5 ml. A noter que les excisions ont été réalisées à partir de gels colorés au bleu de Coomassie et au nitrate d'argent, seules les techniques de décoloration diffèrent.

A.2- Décoloration des bandes : deux types de bandes ont été décolorées à savoir les :

- ✓ *bandes colorées au bleu de Coomassie R-250* : ajouter 100 μ l de tampon de bicarbonate d'ammonium 25 mM, acétonitrile 5 % dans chaque tube eppendorf et laisser incuber pendant 30 min. Après cela, le tampon a été éliminé pour le remplacer

avec le même tampon à 50 % d'acétonitrile et incubé 30 min. Cette étape peut être réalisée encore une deuxième fois jusqu'à décoloration totale.

- ✓ *bandes colorées au nitrate d'argent* : le nitrate d'argent a été décoloré par une solution de Potassium Ferricyanid 30 mM, sodium thiosulfate pentahydrate 100 mM. Ce mélange (2 ml) a été préparé au dernier moment vu son instabilité à la lumière. Puis 200 µl de cette solution ont été ajoutés par tube et laissé à incubé pendant 1 à 2 min, jusqu'à disparition de la coloration à l'argent. La solution a été éliminée, puis deux bains successifs avec 150 µl d'eau pure ont été réalisés pendant 15 min pour stopper la réaction. La décoloration a été continuée en utilisant le protocole de la décoloration au bleu de coomassie tel qu'il est afin de compléter la décoloration à l'argent.

A.3- Déshydratation : les bandes ont été ensuite déshydratées dans 200 µl d'acétonitrile 100% pendant 10 min d'incubation. Le surnageant d'acétonitrile a été ensuite éliminé et les bandes ont été passées au Speed Vac de chez Jouan RC 10.22 pour éliminer le reste d'acétonitrile et compléter le séchage des bandes. Ces dernières sont généralement stoppées à ce stade en les stockant à - 20°C avant de les passer à la spectrométrie de masse.

B- Préparation des protéines pour l'analyse

B.1- Hydrolyse trypsique de la protéine : la protéine est hydrolysée en peptides avec 150 ng d'enzyme. La réhydratation a été effectuée dans 15 µl de bicarbonate d'ammonium 50 mM contenant 10 ng/µl de trypsine Promega (*Sequencing Grade Modified Trypsin*) et suivie d'une incubation de 5 heures dans une étuve Memmert U26 à 37°C.

B.2- Extraction des peptides : les peptides ont été extraits du gel par 8 µl d'acétonitrile 100%, puis agiter au vortex, avant de les passer au bain d'ultrasons pendant 2 min et enfin une incubation de 15 min a été effectuée à 37°C.

B.3- Préparation de la matrice et du calibrant : une solution de matrice en acide alpha cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA) a été préparée à raison de 5 mg/ml dans un mélange (acétonitrile : eau : acide trifluoroacétique ; 50 : 50 : 0,1). Cette préparation est agitée à l'aide d'un vortex puis centrifugée pendant 2 min à 3000g pour éliminer les agrégats non dissous. La matrice est alors prête à être utilisée. Le calibrant ProtéoMix4 (LaserBiolabs) a été préparée à raison de 5 µl qsp 50 µl de matrice CHCA.

B.4- Dépôts sur la cible du MALDI-TOF : Nettoyer (sans frotter) la surface de la plaque à l'eau puis au savon et la rincer à l'eau MilliQ. Déposer sur la cible MALDI 1 μl d'échantillon préalablement vortexé puis 1 μl de matrice. Laisser sécher le dépôt pour que le mélange peptidique se cristallise dans la matrice. Puis déposer 0,4 μl de calibrant à proximité de chaque échantillon, et enfin la plaque est prête à être introduite dans le MALDI-TOF où s'effectue l'irradiation à 337 nm de la matrice co-cristallisée avec le mélange peptidique, en les envoyant au TOF. Ce dernier permet d'analyser les ions produits dans la source MALDI. L'énergie emmagasinée désorbe l'analyte sous forme de plasma dans lequel s'effectue le transfert de protons des molécules de la matrice vers celles de l'analyte, engendrant leur ionisation. Ensuite, l'analyseur temps de vol (ToF) permet d'analyser les ions produits dans la source MALDI en se basant sur le principe que les ions de masses différentes ayant une énergie cinétique constante ($\frac{1}{2} mv^2$) auront une vitesse inversement proportionnelle à leur rapport masse sur charge (m/Z).

En pratique, Plusieurs tirs ont été effectués sur la cible à différents endroits du dépôt analyte/matrice. Les tirs ont été visualisés grâce à une caméra. Nous obtenons un spectre des ions détectés qui évolue à chaque impulsion laser. Le spectre de masse correspond à l'accumulation de l'ensemble des tirs, ce qui permet d'amplifier les signaux obtenus. Une calibration externe est faite en bordure du dépôt avec un calibrant composé d'un mélange de peptides. Puis nous réalisons une calibration interne avec 3 pics remarquables correspondant à des peptides d'autolyse de la trypsine présents dans le spectre de masse de l'analyte. Il s'agit des pics de $m/Z = 842,509$; $1045,564$ et $2211,104$ avec la trypsine Promega utilisée.

C.- Identification des protéines

L'identification s'est faite par interrogation des bases de données protéiques (ex : ProFound, MS-FIT) à partir des masses des peptides obtenus et sélectionnés et des critères à renseigner : la banque de donnée à interroger, la famille, le genre, l'espèce à partir desquels la protéine a été isolée, toutefois la recherche sans renseigner ce critère est plus objective, l'enzyme de digestion, les modifications liées aux traitements de la protéine, la tolérance vis-à-vis des masses des peptides mesurées par rapport aux masses théoriques.

Ces moteurs de recherche comparent le spectre de masse aux spectres de masse virtuels des protéines dont le gène est caractérisé et qui sont rassemblées dans des banques de

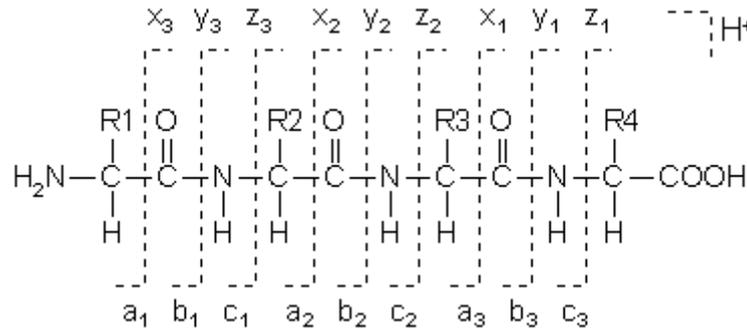
données spécialisées, dans notre cas la base de données utilisée était SWISS-PROT. Cette comparaison est associée à un score fondé sur le nombre de fragments protéolytiques obtenus dont les masses peuvent correspondre à celles des fragments protéolytiques des banques de données, et par la précision avec laquelle les masses sont déterminées. Les meilleurs scores correspondent aux comparaisons les plus fiables.

II.4.2- EPM par spectrométrie de masse MS/MS

Bien que l’empreinte peptidique massique (EPM) obtenue par spectrométrie MS MALDI-TOF soit très performante pour l’identification des protéines, elle a certaines limites notamment dans la caractérisation précise des protéines. En effet, l’information donnée dans la technique EPM est simplement une information de masse de l’ion détecté. L’identification est alors possible que si nous détectons suffisamment de peptides différents d’une même protéine. Si ce nombre de peptide est trop faible ou si la protéine n’est pas dans les banques, il va être difficile par cette technique d’identifier et à fortiori de caractériser la protéine.

C’est pourquoi il est nécessaire d’utiliser un autre appareil de masse que le MALDI-TOF. Cet appareil de masse permet d’obtenir une double empreinte dite MS/MS des peptides et ainsi obtenir l’identification par la séquence d’une protéine qui n’est pas nécessairement présente dans les banques (identification par homologie). Plusieurs appareils avec des technologies différentes (sources, analyseurs) sont présents sur les plateaux d’analyse protéomique. Sur le centre de Theix, le spectromètre de masse MS/MS est un ESI-IT. Cet appareil possède donc une source électrospray qui permet l’ionisation (ESI) et le passage à l’état gazeux des ions dans l’analyseur qui est ici un piège à ions (IT). De plus, pour augmenter le pouvoir d’analyse de cette méthode de masse MS/MS, l’appareil a été couplé à une chaîne chromatographique liquide (LC PACKING) qui permet une séparation des peptides dans un flux constant (200 nl/min) d’un gradient d’acétonitrile. Ainsi, en sortie de colonne, les peptides élués vont rentrer dans l’analyseur du spectromètre de masse (IT), via la source électrospray (ESI), sous forme d’ions gazeux. Un premier spectre de masse (MS) sera alors généré sur la base de la stabilité des ions peptides dans la trappe à ions qui est remplie de gaz hélium. Puis chaque pic de masse détecté dans cette première étape est isolé par des champs électriques variables, puis fragmenté par des collisions avec les atomes d’hélium. Les liaisons peptidiques sont rompues dans cette étape. Les ions fils formés issus de la

fragmentation de l'ion parent détecté dans l'étape MS sont très spécifiques et ont été caractérisés de la manière suivante par Roepstorff et Fohlman (1984).



Pour résumer, nous pourrions observer des fragments amino-terminaux obtenus en cassant une liaison peptidique et en conservant la charge du côté amino-terminal. Ces ions sont appelés a, b ou c. Les fragments carboxy-terminaux sont complémentaires de fragments amino-terminaux mais la charge est localisée du côté carboxy-terminal. Ces ions sont appelés x, y et z. Néanmoins, pour les recherches dans les banques de données, seule l'information sur les ions principaux complémentaires b et y a été utilisée. Les différents moteurs de recherche protéomique (MASCOT, par exemple) vont utiliser des algorithmes mathématiques permettant la comparaison des empreintes observées et théoriques (présentes dans les banques) et ainsi donner un score reflétant le degré d'identité des spectres. Outre l'identification, l'analyse par MS/MS permet de caractériser les protéines pour avoir accès aux modifications post-traductionnelles, aux mutations ou aux modifications chimiques d'acides aminés.

Les analyses MS/MS ont été réalisées avec un spectromètre de masse LCQ Ion Trap (Thermo Electron, Courtabœuf, France) équipé d'une source nanospray. Les peptides élués de la colonne C18 (Pep Map, LC PACKING) ont été ionisés en appliquant une tension de 2 kV en jonction liquide sur une aiguille non métallisée (New Objective, Cambridge, MA, USA). Les peptides ont été alors analysés par la méthode « *data dependent triple-play* ». Cette méthode consiste à faire trois analyses à la suite. La première est une analyse « *full scan* » pour détecter l'ion parent le plus intense, la deuxième est de faire un « *zoom scan* » sur l'ion parent sélectionné et ainsi connaître son état de charge, enfin la dernière est d'isoler cet ion pour le fragmenter avec une énergie de collision de 30 %. Le spectre MS/MS ainsi obtenu est utilisé par MASCOT pour identifier et caractériser le peptide.

Résultats
et
Discussions

Résultats
et
Discussions

Partie I : UBIQUITE DU PHENOMENE
D'APOPTOSE CHEZ DIFFERENTES ESPECES
BOUCHERES.

**PARTIE I : UBIQUITE DU PHENOMENE D'APOPTOSE CHEZ DIFFERENTES
ESPECES BOUCHERES**

PREAMBULE

Si nous considérons que la première phase intervenant lors de l'attendrissage de la viande est l'apoptose, et elle est impliquée dès les premières heures suivant l'abattage, nous réalisons que les peptidases les mieux placées pour altérer la structure contractile seront bien les caspases, puisqu'il s'agit de leur fonction primaire (Ouali *et al.*, 2006). Différentes constatations viennent appuyer aujourd'hui la théorie de sa mise en place dans le muscle *post mortem*, en particulier celle de la dégradation caspasiqque de certains composants clés du cytosquelette, notamment les filaments d'actine (Taylor *et al.*, 2008).

Plusieurs études ont indiqué que l'actine est clivée pendant le phénomène d'apoptose (Asumendi *et al.*, 2000 ; Bursch *et al.*, 2000). Par ailleurs, la dégradation de celle-ci a été mise en évidence pour la première fois dans le muscle *Longissimus dorsi* du rat par Becila *et al.*, (2010). Les fragments d'actine générés ont été proposés comme des marqueurs potentiels d'apoptose (Yang *et al.*, 1998).

Nous avons mis en évidence la dégradation de l'actine dans le muscle *post-mortem* (au stade de la maturation) chez différentes espèces à savoir : poulet de chaire, caprine, bovine, ovine, cameline et poisson. Nous avons focalisé notre attention sur les différents fragments générés après protéolyse en utilisant l'immunoblotting ou la technique du western blot après une électrophorèse en conditions dénaturantes permettant de révéler par un anticorps spécifique uniquement les fragments d'intérêt issus du clivage.

Les résultats des deux études effectuées dans cette partie ont fait l'objet :

- 1- D'une communication affichée lors du 6^{ème} colloque « protéolyse cellulaire » de la Société française de biochimie et de biologie moléculaire (SFBBM) qui s'est déroulé du 28 au 30 novembre 2012 à Clermont-ferrand-France sous le titre : « APOPTOSE : processus précoce après la mort » ;
- 2- D'une publication qui s'intitule : **Highlighting the Degradation of Actin in *Longissimus dorsi* Muscle of Different Species: Bovine, Ovine, Caprine, Poultry and Freshwater Fish**. publiée en 2015 dans le « *British Biotechnology Journal* ». Cette publication a été réalisée avec des étudiants ingénieurs que nous avons encadré pour la réalisation de leur mémoire de fin d'étude. Il s'agit de M. Hasina Rasolofoharitseheno et M. Wisdom Michael Mompfi.

Apoptose: processus précoce après la mort: évidences supportant cette hypothèse et ubiquité du processus

Yasmine BOUIDIDA¹,
Mohammed GAGAOUA¹,
Hanane SMILI¹,
Lamia OUALI¹,
Samira BECILA¹,
Abdelghani BOUDJELLAL¹,
Ahmed OUALI²

¹ INATAA, Université de Constantine, Route de Ain El Bey, 25000 Constantine, Algérie



² INRA, UR370 QuaPA, 63122 Saint Gènes Champanelle, France



Mots clés :
Apoptose,
Caspases, Muscle du rat, Actine, Phosphatidylserine

Introduction

Il a été récemment suggéré que la mort cellulaire serait la première étape de la conversion du muscle en viande. Or, la mort dans un tissu vivant peut se produire par nécrose ou apoptose. Puisque la nécrose n'a jamais été rapportée dans le muscle *post mortem*, le déclenchement de la mort cellulaire par apoptose est l'issue la plus probable. L'apoptose est caractérisée par l'activation d'une famille de protéases à cystéine, les caspases (pour cysteine aspartyl protease). Les caspases vont alors initier la dégradation des structures cellulaires

Objectif

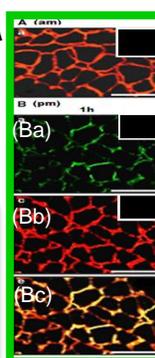
Apporter des preuves en faveur de la mise en évidence de l'apoptose dans le muscle *post mortem*

pour se faire **trois marqueurs d'apoptose** ont été choisis

1 Externalisation des phosphatidylsérines (PS) sur des coupes transversales du muscle de rat (10 µm) *ante mortem* (am) et *post mortem* (1h pm).

révélation des PS : par l'annexine V conjuguée (FITC)

confirmation de l'emplacement extracellulaire des PS : Par un anticorps primaire produit chez le lapin dirigé contre la laminine et un anticorps secondaire anti IgG de lapin marqué à la cyanine 3



A(am)

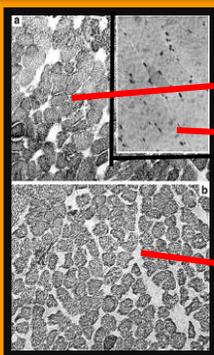
(A) absence d'externalisation des PS avant la mort de l'animal

B(1h pm)

(Ba) et (Bb) : Présence des deux marquages. **cette externalisation est détectable dans les 2 min qui suivent la mort de l'animal** (Ouali et al., 2007).

(Bc) La superposition des deux marquages démontre que le marquage des PS est colocalisé avec la laminine et donc extracellulaire

2 Rétraction cellulaire par observation des coupes transversales du muscle de rat (10µm) ante ,1 h et 24h *post mortem*



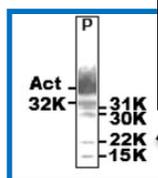
A **1h post mortem**, la taille des cellules est réduite en les comparant avec les cellules *ante mortem* où toutes les fibres sont en contact étroit

A **24h post mortem** l'espace extracellulaire augmente de 30 - 33% en comparant avec la 1^{ère} heure *post mortem*

3 Dégradation de l'actine par

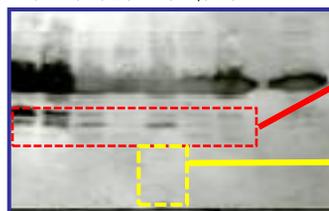
Western Blot en utilisant un anticorps polyclonal dirigé contre l'actine sur des extraits de protéines myofibrillaires des muscles :

rat (**Ra**), ovine (**Ov**), bovine (**Bo**), camelin (**Cam**), caprin (**Cap**), volaille (**Vo**), poisson d'eau douce (**POed**) et d'eau de mer (**POem**).



Chez le rat : présence des fragments d'actine de 32 à 15 KDa

Poed, Poem, Ov, Bo, Cam, Cap, Vo, A ct



Chez les autres espèces : présence de fragments d'actine de 32,28 et 22 KDa

Chez le Camelin : présence de deux autres fragments de 18 et 10 KDa.

Conclusion

Ces résultats confirment la mise en place, dès les premiers instants qui suivent la mort, du processus apoptotique dans les cellules musculaires dont les premières altérations sont probablement liées à l'action des caspases. Ce processus semble commun à toutes les espèces animales. Qu'en est-il pour les organes prélevés en vue de transplantation chez l'homme ?

L'identité des fragments a été confirmée par analyse de spectrométrie de masse par MALDI-TOF. La différence de la dégradation de l'actine peut s'expliquer par une variation du rapport enzyme/inhibiteur entre espèces, reflétant l'efficacité des systèmes protéolytiques.



Highlighting the Degradation of Actin in *Longissimus dorsi* Muscle of Different Species: Bovine, Ovine, Caprine, Poultry and Freshwater Fish

Hasina Rasolofoharitseheno^{1,2*}, Wisdom Michael Mompoti^{1,3}, Yasmine Boudida¹ and Mohammed Gagaoua¹

¹National Institute of Nutrition and Food Processing Technology (INATAA), Mentouri University, Constantine, Algeria.

²Department of Agribusiness, Sebelas Maret University, Surakarta, Indonesia.

³Faculty of Engineering and Health Management, University of Lille 2, Lille, France.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration between all authors. Author HR designed and wrote the manuscript. Author WMM carried out the manuscript proofreading. Authors HR and WMM conducted the laboratory experiments. Authors YB and MG supervised the research. All authors read and approved the final manuscript.

Article Information

DOI: 10.9734/BBJ/2015/17054

Editor(s):

(1) Qiang Ge, University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, Dallas, Texas, USA.

Reviewers:

(1) Stefan Georgiev Dragoev, Department of Meat and Fish Technology, University of Food Technologies – Plovdiv, Bulgaria.

(2) Anonymous, Brazil.

(3) Anonymous, Poland.

(4) Anonymous, Mexico.

(5) Anonymous, Turkey.

Complete Peer review History: <http://www.sciencedomain.org/review-history.php?iid=1044&id=11&aid=9021>

Original Research Article

Received 24th February 2015

Accepted 6th April 2015

Published 6th May 2015

ABSTRACT

This research is aimed at highlighting the degradation of actin in the *Longissimus dorsi* muscle of five species, namely, bovine, ovine, caprine, poultry, and freshwater fish. To reveal the degradation of actin, by Western blotting, the myofibrillar proteins of the five studied species were first separated by using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and colored with coomassie brilliant blue G-250. The colored polyacrylamide gel showed a similarity of the bands' electrophoretic profile in bovine, ovine, and caprine. However, the bands observed in poultry and freshwater fish are specific for each species. The Western blotting revealed the presence of actin fragment of 32 kDa in bovine, ovine, and freshwater fish. A fragment of 28 kDa

*Corresponding author: Email: solofhasina@yahoo.fr;

was found in the five studied species. However, a fragment of 19 kDa was obtained only in caprine. Two fragments of light molecular weights, 15 and 12 kDa, were found in four species such as bovine, ovine, caprine, and poultry. The fragments of 12 and 28 kDa were revealed for the first time by this research, where no previous study has announced their existence.

Keywords: Actin degradation; apoptosis; caspases; meat tenderness; longissimus dorsi muscle.

1. INTRODUCTION

Whatever food product is introduced onto the market, its quality is considered as the most important criterion for consumers. For meat, the organoleptic quality most sought after by consumers is tenderness. Meat tenderness is the result of physicochemical changes, mainly due to enzymatic intervention after slaughter [1]. Enzymatic modifications are caused by endogenous proteolytic systems that degrade particularly the myofibrillar structure [2].

The most studied proteolytic systems in the process of meat tenderization are calpains and cathepsins [3]. However, it has been suggested by some researchers that this tenderization is a multienzyme system where other proteases such as proteasome and caspases may also contribute [1]. The family of cysteine protease, particularly caspases are primordially associated with the programmed cell death known as apoptosis [4].

If we consider that the first process that occurs during meat tenderization is apoptosis and that it is involved in the early hours of slaughter, we realize that the best placed peptidases to alter the contractile structure are caspases, because it is their primary function. Apoptosis is therefore a precocious process that is involved in meat tenderness [1].

Some researchers such as [2,4,5] focused their attention on understanding the mechanisms involved in the morphological changes due to cell death caused by apoptosis and numerous findings have supported the theory of apoptosis involvement in meat degradation caused by caspases of some cytoskeleton key components, particularly actin filaments. The degradation of actin due to caspases has been proved for the first time in the *Longissimus dorsi* muscle of rats by [4].

The actin fragments generated in meat tenderization are seen as potential markers of apoptosis. In this context, it fits the purpose of this study where the apoptosis process in

Longissimus dorsi muscle of five species such as bovine (*Bos taurus indicus*), ovine (*Ovis aries*), caprine (*Capra aegagrus hircus*), poultry (*Gallus gallus domesticus*), and freshwater fish (*Hypophthalmichthys molitrix*) through the study of one biochemical marker, actin degradation, during the muscles' maturation was highlighted.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Research Location

The research was carried out at the pedagogic meat laboratory of INATAA (Institut De Nutrition, Alimentation et Technologies Agroalimentaires), Constantine-Algeria in collaboration with INRA (Institut National de Recherche Agronomique), Clermont Ferrand-France, which provided the anti-actin antibodies.

2.2 Biological Materials

The *longissimus dorsi* muscles of the five studied species used in this research were in the aging process, 48 h postmortem for the bovine, ovine and caprine, 24 h postmortem for the poultry and 9 h postmortem for the freshwater fish. The muscles were taken from males and were immediately kept cold at 4°C after slaughter. The animals' ages are 28 months, 24 months, 9 months, 2.5 months for the bovine, caprine, ovine and poultry, respectively.

2.3 Extraction of Myofibrillar Proteins

The protocol used for the extraction of the myofibrillar proteins (MFPs) was that of [6], 1997. Although, the centrifugation speed used was 3 800 instead of 10 000 rpm, due to the centrifuge available in the laboratory. The pellet of myofibrillars was obtained from 1 g of muscle grinded in the extraction solution, homogenized for 15 seconds in polytron and filtered in order to eliminate the insoluble fractions. The filtrate was incubated at 4°C for 30 minutes with moderate and constant agitations to ensure a better solubilization of the MFPs. The MFPs separation was carried out by centrifuging the extract at 3

800 rpm for 15 minutes at 20°C. The pellet was then washed two times in wash buffer to remove the sarcoplasmic proteins and membranes.

2.4 Myofibrillar Proteins Separation in Polyacrylamide Gel under Denaturing Conditions

The separation of the MFPs on polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS) is a common method used to separate peptide chains based on their molecular weights and is commonly known as SDS-PAGE or Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis [7]. To separate the MFPs, they must be first denatured in presence of SDS so that their migration depends only upon the molecular weights [8]. The denaturation solution contains mainly DTT (dichlorodiphenyltrichloroethane), which is a reducing agent of disulphide groups such as -SH and S-S. The SDS is used to give the same negative charge to all proteins [9]. It also contains glycerol that increases the solution density and avoids the possibility of contaminations.

During the denaturation, the pellet of MFPs with the denaturation solution was heated for 5 minutes. Firstly, to remove the bacterial proteolysis and the action of proteases and secondly, to facilitate the rupture of the -SH liaison. It also allowed the complete denaturation caused by SDS and changed the proteins structure into linear [10]. The denatured MFPs were preserved at -20°C until they were used.

The electrophoresis was conducted based on the protocol of [11], 1970. To follow the migration front, the reference proteins previously colored with blue bromophenol in varying concentrations were deposited in the first well of the gel. The rest of the wells were filled with 5 to 20 µl of bovine (Bv), caprine (Ca), ovine (Ov), poultry (Pl), and freshwater fish (Fwf) myofibrillar proteins.

The migration of the MFPs was effectuated first at 80 volts for about 20 minutes in order to facilitate their accumulation, then at 120 volts for 2 hours in order to carry out their separation based on the molecular weights. Therefore, the proteins with light molecular weight migrated further, however those with high molecular weight traveled only a short distance [12].

The polyacrylamide gel was colored by coomassie brilliant blue G-250, which can reveal

significant amounts of proteins [13]. It was fixed by using fixing solution containing 30% of ethanol and 5% of acetic acid, then colored in a solution containing 10% of acetic acid, 40% of ethanol, and 2.9 mmol of coomassie brilliant blue G-250. Finally, the gel was discolored with the fixing solution in order to highlight the colored protein bands.

To determine the molecular weight (MW) of the different bands, the ratio Rf, mobility of different proteins, was calculated through the gel's reference proteins calibration curves by using Microsoft Excel 2010 software. The reference proteins with their known molecular weight and their calculated Rf permitted to draw the gel calibration curve that gives the following equation type:

$$\text{Log MW} = f(\text{Rf})$$

Where:

$$\text{Rf} = r/R$$

r : proteins mobility

R : total length of the gel

2.5 Revelation of Actin Degradation by Western Blotting

The Western blotting or immunoblot is used to detect the presence of the target protein by using an antibody directed at this protein [10]. This technique first of all utilizes electrophoresis to separate the proteins based on their molecular weights [10]. Next, the separated proteins are transferred into polyvinylidene fluoride membrane. The polyvinylidene fluoride membrane is then subjected to a succession of incubations: Firstly, with the primary antibody that is specific to the target protein (actin) secondly, with the secondary antibody marked with alkaline phosphatase, which is directed at the primary antibody and thirdly, with the specific substrate of the enzyme called alkaline phosphatase. The method utilizes chemical substances that emit luminescence directly proportional to the concentration of the present proteins and which prints a sensitive photographic film [14].

To follow the transfer of the MFPs on the polyvinylidene fluoride membrane, a different range of pre-marked proteins was utilized. The gel was removed from the mould and placed on the polyvinylidene fluoride membrane previously immersed in ethanol solution for 5 minutes, then washed with distilled water and immersed once

again in the transfer buffer for 5 minutes and then placed on the anode.

Two blotting papers (Amersham 80-6205-40) cut to the size of the gel were soaked in the transfer buffer, placed on the polyvinylidene fluoride membrane and under the gel to make a kind of sandwich (Fig. 1). The transfer was carried out in transfer tank at 10 volts for 30 minutes.

Once the transfer was realized, the polyvinylidene fluoride membrane was removed and placed in the saturation buffer during the whole night under constant agitations at ambient temperature. The next day, a series of operations such as follows were done. The membrane was washed for 5 minutes with 20 ml of washing and dilution buffer, incubated with 40 μ l of primary antibody (A2668-Anti-Actin antibody produced in rabbit) and diluted in 20 ml of washing and dilution buffer (dilution 1/500) for 1h 30 mn, washed five times with 20 ml of washing and dilution buffer, incubated with 10 μ l of secondary antibody conjugated with alkaline phosphatase, diluted in 20 ml of washing and dilution buffer (1/2 000) for 1 h 30 mn away from light, washed four times with 20 ml of washing and dilution buffer for 5 minutes, washed two times with 20 ml of washing buffer for two minutes, drained and placed under 1.5 ml of lumiphos reagent for 5 minutes, and then drained once again and placed between two transparent plastic papers.

The degradation of actin was revealed in darkroom and by exposing the membrane that emits light to autoradiography film for 45 minutes. The autoradiography film was immersed in a plastic tube containing a picture developer solution for 10 to 15 sec and rinsed first, by water for 15 sec, by fixer solution for 30 sec, and finally by water once again for 10 sec. If the actin bands appear on the autoradiography film are not clear, the experiment is repeated and the exposure time is increased.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Estimation of the Myofibrillar Proteins Molecular Weight Separated by SDS-PAGE

3.1.1 Determination of the gel's reference proteins calibration curve

The gel calibration curve was determined from the decimal logarithm of the reference proteins'

molecular weights, based on their mobility on the gel. The curve is illustrated in the Fig. 2.

Therefore, the molecular weight of each band appearing on the gel was calculated based on the curve equation: $\text{Log MW} = -1.0436x + 1.991$

Note: $x = r/R$

Where:

r : Proteins mobility

R : Total length of the gel

3.1.2 Identification of the different species proteins

After calculating the molecular weight of each band appearing on the gel, their identification can be done by referring to the literature. The electrophoretic profile of the myofibrillar proteins of each species is shown in the Fig. 3. For a better reading of the images on the gel, its bands were separated into three zones, namely, zone I, II and III. As the aim of the research is to highlight the degradation of actin, the zones did not include bands that have MW greater than 42 kDa.

The Fig. 3 shows that the band representing actin is more intense compared to others. This means that the concentrations of actin in the muscles of the five studied species are important. The differences in the bands observed between the species are indicated in the Figure by using circles of different colors. The zone I corresponds to proteins that have MW between 25 and 42 kDa. Four bands are observed in species such as bovine, caprine, and ovine and three bands for poultry and freshwater fish. The two bands of 37 and 40 kDa are present in bovine, ovine, poultry, and freshwater fish (surrounded by purple circle). According to [15], the molecular weight of 37 kDa corresponds to the Troponin T. A protein band of 30 kDa (surrounded by blue circle) is observed only in bovine. According to [16], this band comes probably from the degradation of the Troponin T. This fragment has been considered by many researchers as a marker of beef aging. The two bands of 31 and 36 kDa (surrounded by white and red circles, respectively) are present only in caprine. According to [4], the band of 36 kDa is probably the troponin T. However that of 31 kDa may come from the degradation of actin [17].

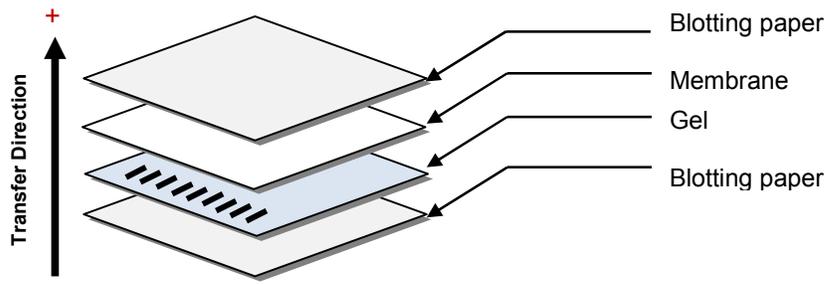


Fig. 1. Protein transfer sandwich by Western blotting

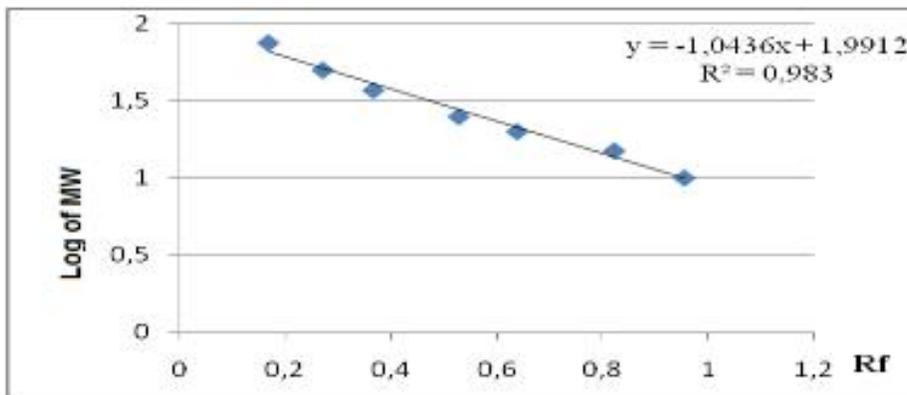


Fig. 2. Calibration curve of the gel's reference proteins

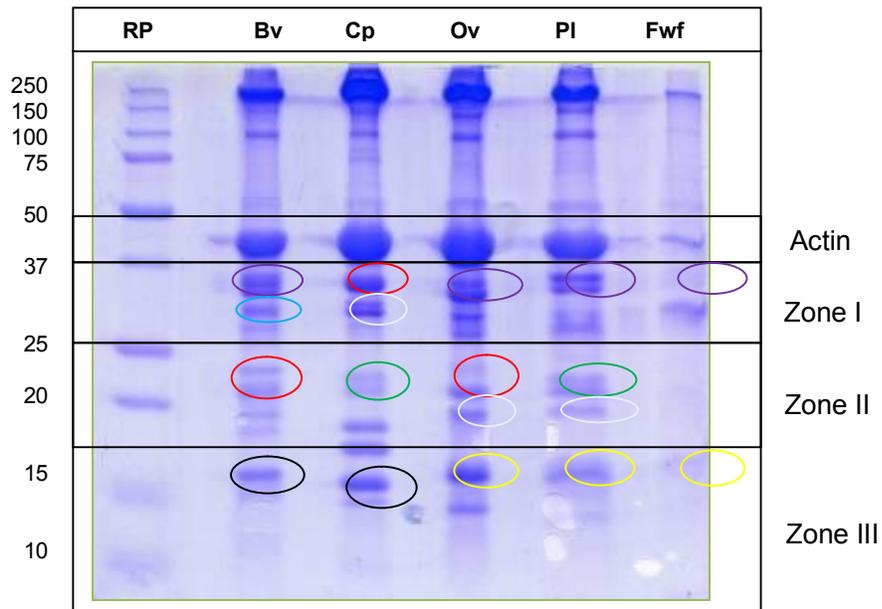


Fig. 3. MFPs' bands colored with coomassie brilliant blue G-250

The zone II corresponds to proteins having molecular weight between 18 and 25 kDa. Four bands are observed in bovine, caprine and freshwater fish and only three in ovine and poultry. The two bands of 21 and 24 kDa (surrounded by red circle) are present only in bovine and ovine. The band of 24 kDa probably corresponds to the chain of myosin [18]. Two bands of 18 and 22 kDa (surrounded by green circle) are present in caprine and poultry. According to [19], the band of 22 kDa is probably the Troponin I. A band of 19 kDa (surrounded by white circle) is also observed in ovine and poultry. According to the same author, this band corresponds to the light chains of myosin.

The zone III corresponds to proteins having light molecular weights, which are smaller than 18 kDa. Two bands are observed in bovine, caprine, ovine, and poultry and only one in freshwater fish. The two bands of 16 and 18 kDa (surrounded by black circle) are present in bovine and caprine, however the band of 14.5 kDa (surrounded by yellow circle) is present in ovine, poultry and fresh water fish. For the ovine, a band of light molecular weight, 12.6 kDa, has also been highlighted.

3.2 Revelation of Actin Degradation in the Different Studied Species

3.2.1 Determination of the film's reference proteins calibration curve

After its development, the film was first transposed on the polyvinylidene fluoride membrane in order to transfer the reference proteins. Once the positions of the reference proteins on the film are known, the calibration curve was drawn. The molecular weights of the

actin fragments are therefore calculated based on the following equation: $y = -1.79x + 2.020$ (Fig. 4).

3.2.2 The fragments of actin revealed by western blotting

The anti-actin antibody by Western blotting revealed the presence of several actin fragments ranging from 12 to 32 kDa (Fig. 5). The fragment of 32 kDa (surrounded by yellow circle) is observed in the bovine, ovine, and freshwater fish. This result confirms the result announced by [4] in 2010 and is also consistent with the study conducted by [20], which notes the apparition of the fragment of 32 kDa in the postmortem muscles. The film revealed also the existence of actin degradation fragment, which has a molecular weight of 28 kDa (surrounded by red rectangle) in the five studied species, namely, bovine, ovine, caprine, poultry, and freshwater fish. No previous study has shown the existence of this fragment so it is considered as an original result. A fragment of 19 kDa (surrounded by purple rectangle) has been revealed only in caprine. This fragment was already cited by [21] when they studied the actin fragments of *plasmodium falciparum*. Then, two fragments of 12 and 15 kDa (surrounded by blue and white rectangles, respectively) have been revealed in four species such as bovine, caprine, ovine, and poultry. The fragment of 12 kDa is not available in the literature, therefore it is also considered as an original result. The fragment of 15 kDa was already identified by some researchers such as [17,22] and is considered as a fragment that comes from the cleavage of actin caused by caspase 3. However, as the film revealed an intense band of actin, 42 kDa, only a part of this protein was degraded.

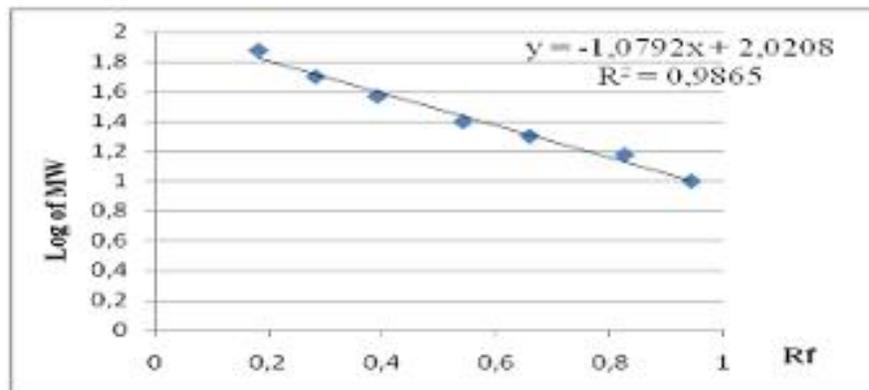


Fig. 4. Calibration curve of the film's reference proteins

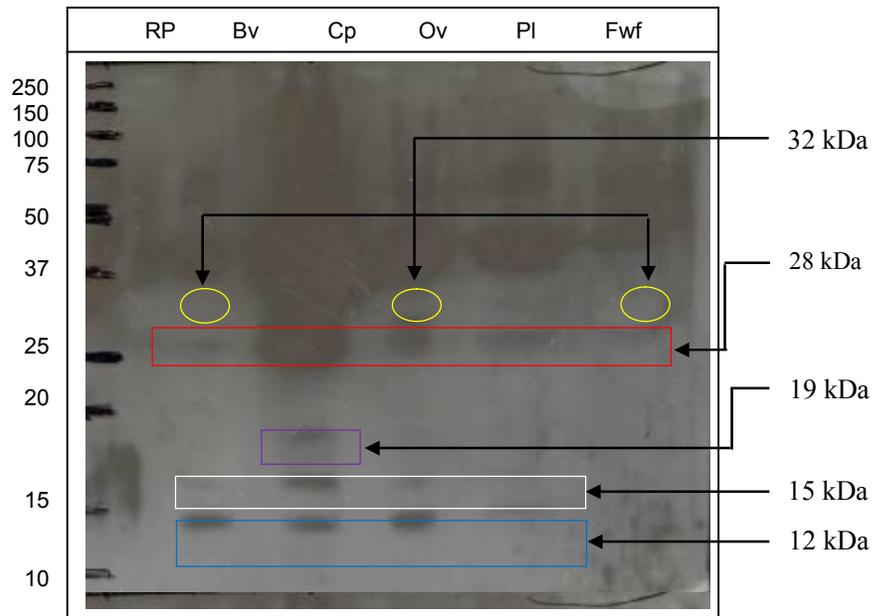


Fig. 5. The fragment of actin revealed by western blotting

4. CONCLUSION

The objective of this research is to highlight the degradation of actin in *Longissimus dorsi* muscle of five species, namely, bovine, ovine, caprine, poultry, and freshwater fish. The research revealed the existence of some actin fragments such as 32, 28, 19, 15 and 12 kDa. The fragment of 32 kDa was found in three species such as bovine, ovine and freshwater fish. The fragment of 28 kDa was revealed in the five studied species. However, the fragment of 19 kDa was obtained only in caprine. The two fragments of light molecular weights, 15 and 12 kDa, were found in four species, namely, bovine, ovine, caprine, and poultry. The fragments of 12 and 28 kDa were revealed for the first time by this research.

The techniques used for this research made it possible to attain the objective, which is highlighting the degradation of actin. However it is desirable to adopt other proteomic techniques, which are more effective and provide clearer characterization of the different bands obtained from the degradation of actin. It is thus recommended to separate the myofibrillar proteins by two-dimensional electrophoresis, characterize the actin fragment identity by mass spectrometry, and realize actin degradation kinetic for each species in order to determine the

postmortem time of the actin degradation apparition.

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

1. Ouali A, Boudjellal A, Becila S. A new deal for the meat maturation understanding. *Meat and Meat Products Journal*. 2006; 24(6):205-213.
2. Ouali A, Herrera-Mendez CH, Coulis G, Becila S, Boudjellal A, Harhoura K, Aubry L, Sentandreu MA. Meat tenderisation and muscle cell death, two highly related events. *Tehnologija Mesa*. 2007;1(2):1-15.
3. Rajani K, Na G, James T. Synthesis, calpain inhibitory activity and cytotoxicity of P₂ substituted proline and thiaproline peptidyl aldehydes and peptidyl α -keetoamides. *Journal of Medical Chemistry*. 2006;49(17):5282-5290.
4. Becila S, Boudjellal A, Ouali A, Sentandreu MA. Post mortem muscle cells die through apoptosis. *Meat and Meat Products Journal*. 2010;24(6):486-493.
5. Taylor RC, Cullen SP, Martin SG. Apoptosis: Controlled demolition at the

- cellular level. *Molecular Cell Biology*. 2008; 9(3):231-241.
6. Zamora F, Debiton E, Lepetit. Predicting variability of ageing and toughness in beef *Longissimus lumborum* et *thoracis*. *Meat Sci*. 1996;43(3):321-333.
 7. Prakash KR, Arunkumar S. SDS-PAGE analysis of serum proteins in giriraja fowl. *International Journal*. 2014;3(4):19-20.
 8. Deepika S, Renu S. SDS-PAGE Analysis of Leaf Galls of *Alstonia scholaris* (L.) R. Br. *Plant Pathology & Microbiology Journal*. 2012;3(2):1-5.
 9. Suvra R, Vikash K. A practical approach on SDS-PAGE for separation of protein. *International Journal of Science and Research*. 2012;3(8):955-960.
 10. Jasim A, Hosahalli S, Ramaswamy, Inteaz A, Vijaya GS, Raghavanb. Protein denaturation, rheology and gelation characteristics of radio-frequency heated egg white dispersions. *International Journal of Food Properties*. 2007;10(1): 145-161.
 11. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680-685.
 12. Petr H, Pavel T, Jiri S, Jiri H, Marie S. Optimized protocol of chicken antibody (IgY) Purification Providing Electrophoretically Homogenous Preparations. *International Journal of Electrochemical Science*. 2013;8(1):113-124.
 13. Sanjeev R, Anusha P, Harsha V, Rajesh M. Seed storage protein profile of few leguminous grains grown in India using SDS-PAGE. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*. 2013;4(4):505-510.
 14. Tiwari U, Agarwal K, Rai A. Expression of human erythropoietin gene in hela cells. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2013;4(2):1129-1137.
 15. Iva M, Jitka K, Jana F, Miroslav S, Marie S, Petr H. Keratin cross-reactivity in electro-transfer (Western blot): How to suppress it. *International Journal of Electrochemical Science*. 2013;8(1):1551-1558.
 16. Han K, Flavin R. Troponin T as a diagnostic marker in the detection of acute myocardial infarction at autopsy. *International Journal of Forensic Science & Pathology*. 2014;2(4):28-29.
 17. Aksakal A. Analysis of whole cell protein profiles of Salmonella serovars isolated from chicken, turkey and sheep faeces by SDS-PAGE. *Veterinary Medicine Journal*. 2010;(6):259-263.
 18. Caddeo C, Teskac K, Sinico C, Kristi J. Effect of resveratrol incorporated in liposomes on proliferation and UV-B protection of cells. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008;3(1):183-191.
 19. Kemp CM, Parr T. The effect of recombinant caspase 3 on myofibrillar proteins in porcine skeletal muscle. *Animal Science Journal*. 2008;2(8):1254-1264.
 20. Dominic MD, Nico MM. Foodomics: Advanced mass spectrometry in modern food science and nutrition. E-book, Departments of Neurology and Biochemistry, University of Tennessee Health Science Center. 2013;1-195.
 21. Suresh PV, Rajesh SJ, Amit K. pH sensitive liposomes enhances immunogenicity of 19 kDa carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium falciparum*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*. 2008;1(1):78-86.
 22. Gagaoua M. Bovine serpins A3: functional relationships with its human homologue, alpha-1-antichymotrypsin. Magister thesis, Mentouri University of Constantine-Algeria. 2011;1-149.

© 2015 Rasolofoharitseheno et al.; This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Peer-review history:

The peer review history for this paper can be accessed here:

<http://www.sciencedomain.org/review-history.php?iid=1044&id=11&aid=9021>

PREAMBULE

Nous avons par la suite étudié en cinétique la dégradation de l'actine dans le muscle *Longissimus dorsi* chez *Cyprinus carpio* (carpe commune) qui est un poisson d'eau douce. Chez cette même espèce, nous avons aussi étudié deux autres marqueurs d'apoptose qui sont :

- 1- La mise en évidence de l'externalisation des phosphatidylserines membranaires par immunohistochimie ;
- 2- La mise en évidence du relargage mitochondriale du cytochrome c au cours du temps *post mortem* par la technique du western blot.

Ces deux marqueurs ont été étudié par Becila *et al.*,(2010) au niveau du muscle *longissimus dorsi* chez le rat.

Les résultats de notre étude ont été valorisés lors des « *61st International Congress of Meat Science and Technology, 23-28th August 2015, Clermont-Ferrand, France* » en proceeding sous le titre :

MUSCLE TO MEAT CONVERSION IN COMMON CARP (*Cyprinus carpio*): NEW INSIGHTS INVOLVING APOPTOSIS.

MUSCLE TO MEAT CONVERSION IN COMMON CARP (*Cyprinus carpio*): NEW INSIGHTS INVOLVING APOPTOSIS

Boudida Y^{1(*)}, Becila S.¹, Gagaoua M.¹, Boudjellal A.¹, Sentandreu M.A.² and Ouali A.³

¹ Equipe Maquav, INATAA, Université des Frères Mentouri Constantine 1, Route de Ain El-Bey, 25000 Constantine, Algeria

² Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC, Avenida Agustín Escardino, 7, 46980 Paterna, Valencia, Spain

³UR370– Theix, 63122 St Genes Champanelle, France UR370, QuaPA, INRA de Clermont Ferrand

(*)Corresponding author : boudida_y@yahoo.fr; yasmine.boudida@umc.edu.dz

Abstract – Tenderization of fish muscle results in its deterioration. Different proteolytic systems exist within the muscular cell. In this decade we have integrated a new process capable to better explain the meat tenderization process namely apoptosis. This process is orchestrated by the family of cysteine aspartate-specific proteases named caspases, which are probably the first proteolytic system to be implicated in *postmortem* proteolysis and meat tenderization. Our study contribute to understanding proteolysis integrating the apoptosis process in the biochemistry of fish muscle. We have chosen three hallmarks of apoptosis: phosphatidylserine (PS) externalization observed by using a FITC-annexin V conjugate as a specific probe, cytochrome c liberation from mitochondria and actin degradation by western blot using a polyclonal anti-actin and anticytochrome c (Cyt c) antibody. Results demonstrate that proteolysis begin just after fishing and confirmed the degradation of actin probably by caspase 3 and release of cytochrome c by mitochondria immediately after death. These results must be completed in future works to elucidate the mechanisms of action of these proteolytic systems. Key Words – fish proteolysis, apoptosis, caspases

I. INTRODUCTION

Proteolysis plays a critical role in postmortem aging of muscle resulting in tenderization, a clear understanding of the mechanisms responsible remains elusive. In contrast to mammalian muscles, for which tenderness is beneficial to meat quality, tenderization of fish muscle results in its deterioration and loss of quality [1-2-3-4].

The meat tenderising process is unanimously recognized to be enzymatic in nature [6]. In fish muscle, different proteolytic systems exist within the muscular cell: a multicatalytic complex or proteasome, a lysosomal system including aspartic and cysteine acidic cathepsins, the cytosolic

calcium dependent calpains, as well as cytoplasmic aminopeptidases, alkaline proteases, and connective tissue hydrolytic enzymes such as elastase and collagenase [2-5].

Ouali [6] proposed to reconsider the knowledge accumulated on meat ageing by integrating a new possible way to explain meat tenderisation namely programmed cell death or apoptosis. This process is orchestrated by a family of cysteine aspartate-specific proteases called caspases [7]. In postmortem muscle, caspases are probably the first proteolytic system to be implicated in *postmortem* proteolysis and meat tenderization [6-7]. Some recent studies have proved apoptosis onset in post mortem skeletal muscle cells by observing a rapid phosphatidylserine (PS) externalization, cell shrinkage [8], and a progressive degradation of actin by caspases [9-10]. Evidence has shown that the first step of the conversion of muscle to meat is the triggering of programmed cell death or apoptosis. However, there were quite a few studies that correlate the apoptosis with meat quality, thus being the actual processes of meat quality development far to be understood [10]. This study was designed to improve our understanding on the proteolysis integrating the apoptosis process in fish muscle biochemistry. Three different hallmarks of apoptosis have been selected and monitored during the first few days after animal bleeding. These are phosphatidylserine (PS) externalization, cytochrome c liberation from mitochondria and actin degradation, a protein proposed to be a good marker of apoptosis development.

II. MATERIALS AND METHODS

Animals and muscle sampling. Ten common carp (*Cyprinus carpio* L.), 15-20 cm body long were captured from Beni Haroune dam and

used in the present work. Animals were killed by decapitation, and *longissimus dorsi* were excised at 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10 and 24 h postmortem. Muscles were maintained on the carcass. Carcasses were stored on ice at 0 C for 2 days.

pH measurement. Longissimus Muscle samples (0.5 g) were homogenized in 9 volumes of cold 5 mM iodoacetate, and the pH determined on the suspension using a WTW pH meter (Amilabo, Chassieu, France) equipped with a combined glass electrode.

Postmortem proteolysis, actin degradation and cytochrome C liberation. Proteolysis, time course degradation of actin and cytochrome c (cyt c) liberation were investigated using fish Longissimus muscle from the same animals. After animal bleeding, muscle was maintained on the carcass, and samples were collected at each sampling times (0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10 and 24 h postmortem) for pH measurement, actin proteolysis and cytochrome C liberation. For extraction of myofibrillar proteins we refer to [11]. After that, Samples were subjected to SDS-PAGE (12%) according to Laemmli [12]. Actin degradation and cytochrome c liberation were therefore followed by western blot using a polyclonal anti-actin and anticytochrome c antibody, as previously described [13].

Phosphatidylserine (PS) externalization. We have used a FITC-annexin V conjugate as a specific probe to bind PS. To attest the extracellular location of PS, we referred to laminin, a major component of the basal lamina. In living cells, the primary function of the laminin protein family is the anchorage of the plasma membrane to the extracellular matrix. Hence, these proteins are located in the vicinity of the external leaflet of the plasma membrane [14] and constitute an interesting internal control to verify that the PS labeling is extracellular and not intracellular. Phosphatidylserine externalization was investigated using strips from *longissimus dorsi* muscles excised 0 h and 6 h postmortem. (For experimental details see [8].

III. RESULTS AND DISCUSSION

PS externalization Regarding postmortem samples, as depicted in Fig.1 A-B-AB (0h

postmortem sample) and Fig.1 C-D-CD (6h). Immunostaining of fish muscle fibers prepared 0 h (Fig.1 B) or 6h (Fig.1 D) postmortem with a laminin rabbit polyclonal antibody revealed with a cyanin 3-conjugated goat anti-rabbit IgG led to specific fluorescent red. Merging images corresponding to laminin and PS labeling led to a yellow color, a result indicative of a co-localization of laminin and PS-bound annexin V. Such color change was observed both in 0 h (Fig.1 AB) and 6 h (Fig.1 CD) postmortem samples. The co-localization of both antigens confirms that annexin V is bound to extracellular PS and not to intracellular acidic phospholipids. It is noteworthy that the yellow color is more intense in the 6h sample, suggesting an increase in the number of externalized PS between 0 and 6 h postmortem.

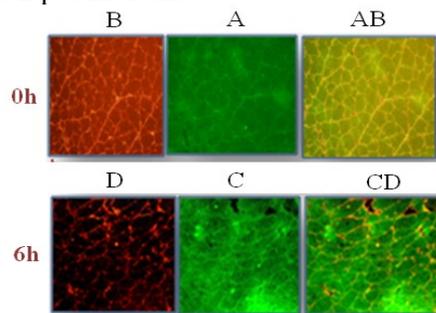


Fig.1- Samples from fish longissimus muscle excised 0 h postmortem. (0h) and 6 h postmortem (6 h). Samples were primarily labeled with a FITC annexinV conjugate at 0 h (A) and 6h (C) postmortem. Note the greater fluorescent labeling of the 6h sample when compared to 0 h. The same samples were then labeled with a rabbit specific laminin antibody revealed with a cyanine 3-goat anti-rabbit IgG conjugate at 0 h (B) and 6 h postmortem (D). Note the lower fluorescent labeling of the 6 h sample when compared to 0 h probably indicative of the degradation of the laminin. Merge images from 0-h samples (AB) and 6h samples (CD).

Proteolysis. Proteolysis of cytoskeletal components results in myofilament degradation [15-16]. In fish, depending on species, this may include degradation of titin, nebulin, dystrophin [17-18-19], α -actinin release [20-21], myosin proteolysis, and tropomyosin delocalization [18]. Most of the changes are common among different fish species but they may occur at different rates. Different proteolytic systems are involved for this proteolysis. We have: a multicatalytic complex or proteasome, a lysosomal system including aspartic and cysteine acidic cathepsins, the cytosolic calcium dependent calpains and, more recently, caspases. In postmortem muscle, caspases are probably the first proteolytic system to be

implicated in *postmortem* proteolysis and meat tenderization [6-7]. In our study we have detected three areas (I, II, III) of proteins degradation (Fig.2). In addition, by means of western blotting using a rabbit polyclonal anti-actin antibody we have confirmed the degradation of actin, probably by the action of caspase 3 by (Fig.3).

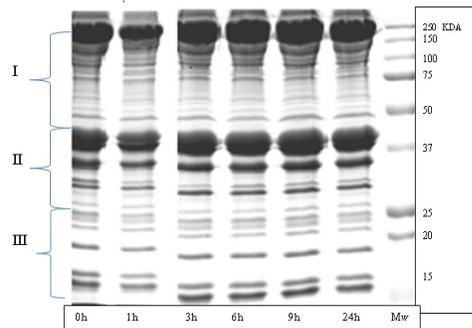


Fig.2. 12% SDS-PAGE of the protein degradation profile of fish muscle (supernatant). There are three areas: I, II and III indicating different molecular mass values. I: 175- 47 KDa, II: 47- 30 KDa, III: 30- 14 KDa. This profile demonstrate that proteolysis begin early at 0h post mortem and We got the same protein fragments with all times post mortem.

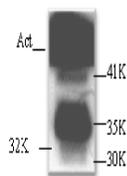


Fig.3: Actin fragments identified in the soluble fraction of fish L. muscle having molecular mass values around 41, 35, 32 and 30 kDa, respectively

Actin degradation and liberation of cytochrome c. Degradation of actin and liberation of cyt c were investigated by SDS-PAGE at different postmortem sampling times. In the soluble fraction (supernatant), western blot carried out with a polyclonal anti-actin antibody revealed a series of fragments with Mr ranging between 41 and 30 KDa (Fig.3). The amount of the 32-kDa actin fragment increased sharply just after death and reached its maximum level about 4–5 h postmortem. Interestingly, this maximum coincides with the pH plateau observed between 4 and 5 h postmortem. The amount of 32 KDa decreased thereafter to reach a minimum level about 24 h postmortem suggesting that this fragment is further degraded to smaller ones not detectable by western blotting in the soluble fraction (Fig.4) As assessed by western blot and densitometry on the release of cyt c into the

cytosol starts immediately after death and reach its maximum concentration about 10 h postmortem at a pH value of 6.8 (Fig.4). These results match with the study of Becila [8].

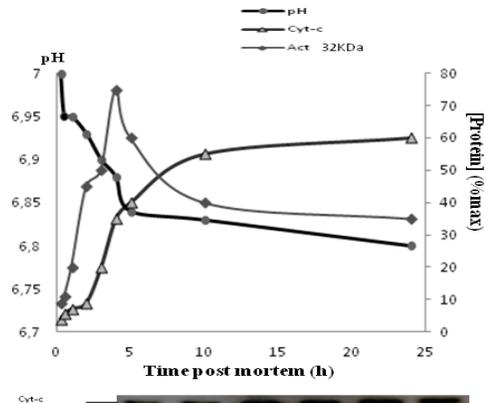


Fig.4: Postmortem changes in muscle pH, soluble 32 kDa actin fragment levels and in the extent of Cytochrome c release in *Longissimus* fish muscle maintained on the carcass which was stored at 0°C for 24 h.

IV. CONCLUSION

Proteolysis and improper storage of whole fish will cause undesirable changes in the texture of many fishes. In this report we demonstrate that proteolysis begin early and just after fishing. Several enzymatic mechanisms generate proteolysis and the recent one is provided by apoptotic caspases. The mastery of their mode of action just after fishing will help to ensure the freshness of the fish. Further works are needed to elucidate the mechanisms of action of these systems.

ACKNOWLEDGEMENTS

Many thanks to Thierry ASTRUC, and Roland LABAS (QuaPA, UR 370, INRA) for their invaluable assistance in light microscopic studies. Dr ABDELLOUCHE (Hospital of setif, Algéria) for his help in the achievement of the cryostat sections.

REFERENCES

- [1]- Delbarre-Ladrat,C. , Verrez-Bagnis,V., Noel,J. & Fleurence, J. (2004). Relative contribution of calpain and cathepsins to protein degradation in muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Food Chemistry* 88 389–395
- [2]- Delbarre-Ladrat,C., Chéret,R., Taylor, R. & Verrez-Bagnis, V. (2006): Trends in Postmortem Aging in Fish: Understanding of Proteolysis and Disorganization of the

- Myofibrillar Structure, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46:5, 409-421
- [3]-Lin, T.M. and Park, J.W. (1996), "Protein solubility in Pacific whiting affected by proteolysis during storage", *J. Food Sci.*, Vol. 61 No. 3.
- [4]- Fraser, O., Sumar, S. (1998), "Compositional changes and spoilage in fish - an introduction", *Nutrition & Food Science*, Vol. 98 Iss: 5 pp. 275 – 279
- [5]- Wanga, P. A., Vang, B., Pedersen A. M., Martinez, I, & Olsen, R. L. (2011) Post-mortem degradation of myosin heavy chain in intact fish muscle: Effects of pH and enzyme inhibitors. *Food Chemistry* 124 1090–1095
- [6]-Ouali, A., Herrera-Mendez, C. H., Coulis, G., Becila, S., Boudjellal, A., Aubry, L., & Sentandreu, M. A. (2006). Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Science*, 74(1), 44–58.
- [7]-Kemp, C. M., & Parr, T. (2012). Advances in apoptotic mediated proteolysis in meat tenderisation. *Meat Science*, 92: 252-259.
- [8]-Becila, S., Herrera-Mendez, C. H., Coulis, G., Labas, R., Astruc, T., Picard, B., Boudjellal, A., Pelissier, P., Bremaud, L., & Ouali, A. (2010). Postmortem muscle cells die through apoptosis. *European Food Research and Technology*, 231(3), 485–493.
- [9]-Feng Huang, Ming Huang, Guanghong Zhou, Xinglian Xu, and Mei Xue (2011) In Vitro Proteolysis of Myofibrillar Proteins from Beef Skeletal Muscle by Caspase-3 and Caspase-6. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 9658–9663
- [10]- Muhan Zhang, Daoying Wang, Wei Huang, Fang Liu, Yongzhi Zhu, Weimin Xu and Jinxuan Cao. Apoptosis during postmortem conditioning and its relationship to duck meat quality *Food Chemistry* 138 (2013) 96–100
- [11]- Gagaoua, M., Moloney, A.P., Nuereberg, K., Bauchard, D., Boudjellal, A., Scollan, N.D., Richardson, R.I., and Picard, B., Terlouw, E.M.C., Micol, D., Hocquette, J-F. (2014). Characteristics of muscle and sensory qualities of meat from cattle produced in a range of systems in Europe. *Livestock Science*, In press
- [12]. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680–685
- [13]. Aubry L, Sentandreu MA, Levieux D, Ouali A, Dutaud D (2006) Bovine muscle 20S proteasome. III: Quantification in tissue crude extracts using ELISA and radial immunodiffusion techniques and practical applications. *Meat Sci* 74:345–353
- [14]. Colognato H, Yurchenco PD (2000) Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dynam* 218:213–234
- [15] Busconi, L., Folco, E.J., Martone, C.B., and Sanchez, J.J. 1989. Postmortem changes in cytoskeletal elements of fish muscle. *J. Food Biochem.*, 13:443–451.
- [16] Ofstad, R., Egelendsdal, B., Kidman, S., Myklebust, R., Olsen, R.L., and Hermansson, A.-M. 1996. Liquid loss as effected by post mortem ultrastructural changes in fish muscle: cod (*Gadus morhua* L) and salmon (*Salmo salar*). *J. Sci. Food Agric.*, 71:301–312.
- [17] Seki, N., and Watanabe, T. 1984. Connectin content and its post-mortem changes in fish muscle. *J. Biochem.*, 95:1161–1167.
- [18] Astier, C., Labbe, J.-P., Roustan, C., and Benyamin, Y. 1991. Sarcomeric disorganization in post-mortem fish muscles. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100B(3):459–465.
- [19] Papa, I., Taylor, R.G., Astier, C., Ventre, F., Lebart, M.C., Roustan, C., Ouali, A., and Benyamin, Y. 1997. Dystrophin cleavage and sarcolemma detachment are early post mortem changes on bass (*Dicentrarchus labrax*) white muscle. *J. Food Sci.*, 62(5):917–921.
- [20] Papa, I., Alvarez, C., Verrez-Bagnis, V., Fleurence, J., and Benyamin, Y. 1996. Post mortem release of fish white muscle α -actinin as a marker of disorganisation. *J. Sci. Food Agric.*, 72(1):63–70.
- [21] Tsuchiya, H., and Seki, N. 1991. Action of calpain on α -actinin within and isolated from carp myofibrils. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57(6):1133–1139.

Résultats
et
Discussions

Partie II : ACTIVITE INHIBITRICE DES
SERPINES BOVINES

PARTIE II : CARACTERISATION DES SERPINES BOVINES ET LEUR ROLE POTENTIEL DANS LA REGULATION DU PHENOMENE D' APOPTOSE DANS LE MUSCLE *POST MORTEM* - Résultats concernant le rôle des serpinines bovines dans la régulation de processus apoptotique

PREAMBULE

Malgré les grands efforts déployés au cours des dernières décennies pour mieux comprendre les mécanismes biochimiques qui se déroulent dans le muscle *post-mortem*, de nombreuses questions demeurent non résolues. Parmi eux, les processus protéolytiques responsables de l'hydrolyse des principales protéines structurales est l'un des plus pertinents par rapport à l'attendrissage *post-mortem* de la viande.

De façon inattendue, les recherches menées au début des années 1990 démontrent que le niveau d'inhibiteur des protéases dans le muscle est un meilleur prédicteur de la tendreté de la viande que celui de leur enzyme cible (Ouali et Talmant, 1990; Shackelford *et al.*, 1991). L'activité de ces systèmes protéolytiques est régulée par des inhibiteurs spécifiques. La calpastatine inhibe spécifiquement les Calpains et est probablement l'inhibiteur de protéase le plus étudié dans le domaine de la science de la viande. L'activité des cathepsines est régulée par une famille d'inhibiteurs de la cystéine peptidase connus sous le nom de cystatines, mais ils ont été beaucoup moins étudiés dans les muscles.

L'efficacité du système protéolytique endogène est principalement déterminée par le niveau de leurs inhibiteurs spécifiques (Ouali & Talmant, 1990, Shackelford *et al.*, 1991). Ceci a été confirmé dans des études antérieures par Zamora *et al.* (1996, 2005) qui ont démontré qu'après la saignée des animaux, les taux d'inhibiteurs de serine-protéases est le meilleur prédicteur de tendreté de la viande parmi une trentaine de variables quantitatives mesurées. Il est intéressant de noter que la plupart d'entre eux appartiennent à la superfamille des serpinines (inhibiteurs de la sérine-protéase) et certains ont également été de puissants inhibiteurs des caspases (Herrera-Mendez *et al.*, 2009), un groupe protéolytique de cysteine protéases considéré comme le principal inducteur d'apoptose (Li *et al.*, 2004 ; Danial *et al.*, 2012)

En raison de leur rôle majeur dans la régulation *post-mortem* de la protéolyse, les serpines ont été étudiés et caractérisés au cours des dernières décennies (Ouali *et al.*, 2013). Les inhibiteurs de protéases sont ubiquitaires dans le règne animal mais nos connaissances sont limitées par rapport à leurs fonctions biologiques dans le muscle squelettique bovin.

Tassy (1998), Tassy *et al.*, (2005) et Herrera-Mendez *et al.*, (2006) ont purifiés trois serpines à partir du muscle de bovin. Ces serpines ont été identifiées sur la base de leurs séquences N-terminales et caractérisées. Il s'agit :

- De l'antithrombine III ou serpin C 1 (Herrera-Mendez *et al.*, 2006),
- De la serpin A 3 1 bovine ou Bovserpin A 3 1 et de la la serpin A 3 3 ou Bovserpin A 3 3 (Tassy, 1998 ; Tassy *et al.*, 2005; Herrera-Mendez *et al.*, 2006).

Notre présent article : **Serine Protease Inhibitors as Good Predictors of Meat Tenderness: Which Are They and What Are Their Functions?** Passe en revue les principaux résultats concernant, la caractérisation des inhibiteurs de serines peptidases dans le tissu musculaire bovin, de leurs protéases cibles et de leurs fonctions biologiques et leur implication dans l'attendrissage *post-mortem* de la viande.

Serine Protease Inhibitors as Good Predictors of Meat Tenderness: Which Are They and What Are Their Functions?

YASMINE BOUDIDA,¹ MOHAMMED GAGAOUA,¹ SAMIRA BECILA,¹
BRIGITTE PICARD,² ABDELGHANI BOUDJELLAL,¹ CARLOS H. HERRERA-MENDEZ,³
MIGUEL SENTANDREU,⁴ and AHMED OUALI⁵

¹Equipe Maquav, INATAA, Université Frères Mentouri, Constantine, Algeria

²UMR1213 Herbivores, URH - AMUVI, INRA de Clermont Ferrand Theix, St Genès Champanelle, France

³Agroindustrial Engineering Department, Universidad De Guanajuato, Salvatierra, Guanajuato, Mexico

⁴Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC, Burjassot (Valencia), Spain

⁵UR370, QuaPA, INRA de Clermont Ferrand – Theix, St Genès Champanelle, France

*Since years, serine proteases and their inhibitors were an enigma to meat scientists. They were indeed considered to be extracellular and to play no role in postmortem muscle proteolysis. In the 1990's, we observed that protease inhibitors levels in muscles are a better predictor of meat tenderness than their target enzymes. From a practical point of view, we therefore choose to look for serine protease inhibitors rather than their target enzymes, i.e. serine proteases and the purpose of this report was to overview the findings obtained. Fractionation of a muscle crude extract by gel filtration revealed three major trypsin inhibitory fractions designed as F1 (Mr:50–70 kDa), F2 (Mr:40–60 kDa) and F3 (Mr: 10–15kD) which were analyzed separately. Besides antithrombin III, an heparin dependent thrombin inhibitor, F1 and F2 comprised a large set of closely related trypsin inhibitors encoded by at least 8 genes *bovSERPINA3-1* to *A3-8* and able to inhibit also strongly initiator and effector caspases. They all belong to the serpin superfamily, known to form covalent complexes with their target enzymes, were located within muscle cells and found in all tissues and fluids examined irrespective of the animal species. Potential biological functions in living and postmortem muscle were proposed for all of them. In contrast to F1 and F2 which have been more extensively investigated only preliminary findings were provided for F3. Taken together, these results tend to ascertain the onset of apoptosis in postmortem muscle. However, the exact mechanisms driving the cell towards apoptosis and how apoptosis, an energy dependent process, can be completed postmortem remain still unclear.*

Keywords Serine protease inhibitors, serpins, caspases, apoptosis, cell differentiation, bovine muscle

INTRODUCTION

In the 80's, the presence of serine proteases within muscle cells was doubtful and a large set of investigations suggested that some of them if not all originated from mast cells (For

review see (Ouali, 1990). The major serine proteases identified in mast cells that are in charge of the secretion of essential molecules including heparin, serotonin and else, are known as chymases and tryptases (Pejler et al., 2007). Later on, several serine proteases were shown to be synthesized by muscle cells including plasmin, thrombin, kallikrein and others (reviewed in (Sentandreu et al., 2002).

It is well documented in the literature that, between the many quality attributes of meat, tenderness is considered as the most relevant by consumers. This attribute is going to strongly influence them in their decision to repurchase that meat (Jeremiah and Gibson, 2003). In relation to this, we have

Y. Boudida and M. Gagaoua contributed equally to the work and to this report.

Address correspondence to Dr Ahmed Ouali, INRA Clermont-Theix, 63122 St Genès Champanelle. E-mail: oualiahmed935@yahoo.fr

Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at www.tandfonline.com/bfsn

to stress forward that one of the main problems that nowadays the meat industry has to face is still the large variability of the final meat tenderness of carcasses and the impossibility to predict such variability. This situation is directly related to the complexity and biological diversity of skeletal muscle tissue. In addition to this, variability comes also from the complex biochemical reactions that take place during the conversion of muscle into meat just immediately after animal slaughter. Even if efforts have been made during the last decades in order to better understand these mechanisms, still many questions remain to be answered. What it is clear is that between these mechanisms, hydrolysis of the main structural proteins conforming myofibrils is one of the most relevant. These structural proteins would include specific myofibrillar and costamere proteins such as actin, myosin, titin, desmin and vinculin (Kemp et al., 2010). This protein breakdown is assumed to be caused by the proteolytic action of different endogenous muscle enzyme groups during carcass storage, a period known as meat ageing. However, the relevance that the different groups of muscle peptidases can have in this process has been a matter of controversy for a long time. Over the last three decades, meat scientists have focused their efforts on the study of two main enzyme systems known as cathepsins, the first group of proteases to have been identified (De Duve et al., 1955) and calpains, a calcium dependent cysteine protease identified in the 1960's (Guroff, 1964). Unexpectedly, investigations carried out in the beginning of the 1990's demonstrate that the proteases inhibitor level in muscle is a better predictor of meat tenderness than that of their target enzyme (Ouali and Talmant, 1990; Shackelford et al., 1991). This explains our major interest in protease inhibitors in the following years (Ouali et al., 1995). Activity of these proteolytic systems is indeed finely regulated by specific inhibitors. Calpastatin specifically inhibits calpains, and is probably the most studied protease inhibitor in the meat science field. Activity of cathepsins is regulated by a family of cysteine peptidase inhibitors known as cystatins, but they have been much less studied in muscle.

In the scientific community of meat scientist, it is a general belief that the calpain-calpastatin system plays a major role in meat tenderization postmortem. However, the fact that other proteases also play an important role is gradually gaining attention. Several groups indeed think that postmortem proteolysis of meat proteins is a multienzymatic process involving a large set of proteases. In this context, knowledge of the specific biological functions of these proteases *in vivo* will be a prerequisite for the improvement of our understanding of the tenderizing mechanisms and for the search of biological markers of tenderness as well. To the previously mentioned proteases, we must add some others that still have not been so deeply studied in the meat science field. This is the case of the proteasome and, more recently, the caspases, a particular group of cystein peptidases responsible for programmed cell death or apoptosis in cells, a phenomenon that has been proved to occur in postmortem muscle (Becila et al., 2010). In

addition to this, as already pointed out, muscle tissue contains numerous other proteolytic enzyme groups that would have the potential to degrade a large set of muscle proteins. This is the case of muscle serine peptidases (Sentandreu et al., 2002).

Although the contribution of serine proteases to meat tenderization has never been clearly demonstrated, several studies identified muscle serine protease inhibitors' level as one of the best predictor of meat tenderness as compared to the concentration of calpains 1 and 2, calpastatin and cysteine protease inhibitors (Zamora et al., 1996; Zamora et al., 2005). The fact that proteases inhibitor level is a better predictor of meat tenderness than their target enzyme explained the aroused interest to identify them and their target proteases as well (Ouali and Talmant, 1990; Shackelford et al., 1991).

Based on these different observations and because of the probable importance of serine proteases in meat tenderization we decided to screen for serine proteases inhibitors in bovine muscle, to try to identify and characterize them and to identify their potential target intracellular proteases. For this purpose the bovine muscle selected was *M. Diaphragma pedialis*, a muscle containing, as all slow twitch muscles including heart, high amounts of proteases and inhibitors. The present work reviews all the work carried out by our group during more than one decade in relation to the characterization of serine peptidase inhibitors in muscle tissue, their potential target enzymes, their possible biological functions, and their potential role in postmortem muscle proteolysis and the development of meat tenderness.

MAJOR SERINE PROTEINASE FRACTIONS IN MUSCLE CRUDE EXTRACT

As previously mentioned, muscle crude extract prepared as described by (Bige et al., 1985) contained a large set of serine protease inhibitors exhibiting different Mr ranging from 10 to 85 kDa. For a purpose of clarity, analysis of the fractions obtained after gel filtration of the ammonium sulfate concentrated crude muscle extract on a Sephadex G100 superfine column (100 cm × 5 cm) were carried out separately. This step allowed the separation of three fractions called F1, F2 and F3 with Mr of about 85–60, 40–60 and 10–14 kDa respectively (Fig. 1).

Each of the three fractions, F1, F2 and F3, was analyzed separately for identification of their composition in serine protease inhibitors and their identification at the protein and gene level.

INHIBITORS PURIFIED FROM THE F1 FRACTION

Using different chromatography protocols, two trypsin/elastase inhibitors and a trypsin/thrombin inhibitor were purified to homogeneity and characterized (Tassy, 1998; Tassy et al., 2005; Herrera-Mendez et al., 2006b; Herrera-Mendez

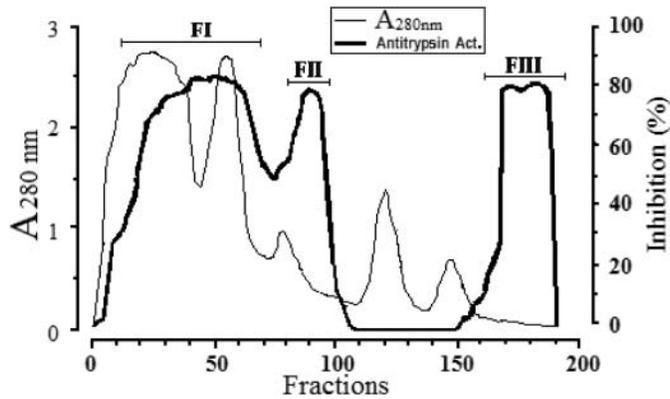


Figure 1 Elution profile of a muscle crude extract from a Sephadex G100 superfine column (5×100 cm) and profile of antitrypsin-activity (Herrera-Mendez et al., 2006b).

et al., 2010;). From the N-terminal partial sequences obtained by the EDMAN sequencing method, they were identified as:

–Trypsin/elastase inhibitors

- Bov-Serpin A3.1 previously designed Endopin 1A (Tassy, 1998; Tassy et al., 2005; Herrera-Mendez et al., 2006b; Herrera-Mendez et al., 2010)
- Bov-Serpin A3.3 previously designed Endopin 1B (Herrera-Mendez et al., 2006b)

–Trypsin/Thrombin inhibitor

- Antithrombin III (Herrera-Mendez et al., 2010)

From the F2 fraction, we failed to purify to homogeneity any serine proteinase inhibitor probably because all inhibitors of this fraction shared very close physicochemical properties.

All inhibitors from the F1 fraction are members of the serpin superfamily. Let's introduce now some basic concepts concerning this large and particular protein protease inhibitors family.

GENERAL PROPERTIES OF SERPINS

The Serpin Superfamily

Serpins are a group of proteins with similar structures that were first identified as a set of proteins able to inhibit proteases. The acronym serpin was originally coined because many serpins inhibit serine proteases (SERine Protease INhibitors). Over 3000 serpins have now been identified; these include 36 human proteins, as well as molecules in plants, fungi, bacteria, archaea and certain viruses (Law et al., 2006; Olson and Gettins, 2011). Serpins are thus the largest and most diverse family of protease inhibitors.

While most serpins control proteolytic cascades, certain serpins do not inhibit enzymes, but instead perform diverse functions such as storage (ovalbumin), hormone carriage

proteins (thyroxine-binding globulin) and tumor suppressor genes (maspin). The term SERPIN is used to describe these latter members as well, despite their non-inhibitory function. Inhibitory serpins were later shown to be cross-class inhibitors since they were shown to be able to inhibit other groups of proteases especially cysteine peptidases (for review see (Silverman et al., 2001; Gettins, 2002).

Inhibitory serpins are generally highly metastable proteins comprising several α -helices (eight or nine) and β -sheets together with an external reactive center loop (RCL) containing the active site recognized by the target peptidase (Fig. 2a). The sequence of the RCL defines the enzyme specificity pattern of each serpin. All inhibitory serpins are irreversible covalent “suicide” protease inhibitors forming a highly stable covalent complex with their target enzyme, a complex

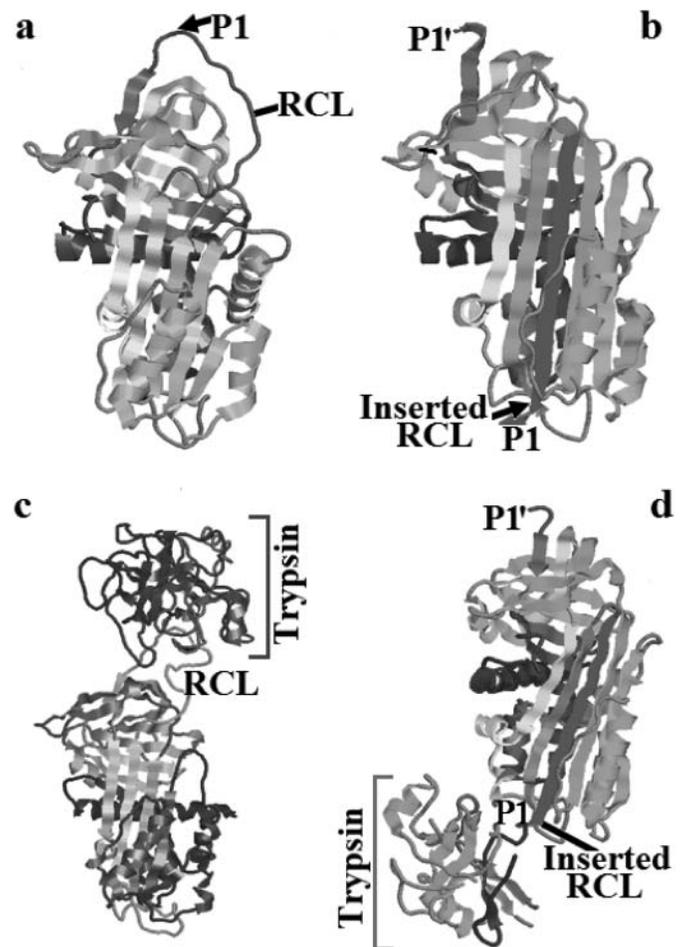


Figure 2 Serpin structures and conformation. (a), native α_1 -AT (Protein Data Bank (PDB) entry 1QLP) (Elliott et al., 2000); (b), cleaved α_1 -AT (PDB entry 7API) Upon RCL cleavage, the loop inserts into the serpin core constituting an additional strand (Engh et al., 1989); (c), Michaelis complex between Serpin A1 (Alaserpin from *Manduca sexta*) and trypsin (PDB entry 1I99 (Ye et al., 2001); (d), covalent complex between α_1 -AT and trypsin (PDB entry 1EZX). The enzyme is transported to the distal part of the serpin and undergoes an irreversible deformation responsible of the enzyme inactivation (Huntington et al., 2000). In (b) and (d) the inserted RCL is in purple. AT, antitrypsin or SERPINA1.

detectable after gel electrophoresis in denaturing conditions (SDS-PAGE). (For more details see also the following reviews: (Silverman et al., 2001; Silverman et al., 2010; Whistock et al., 2010; Olson and Gettins, 2011). A large set of information together with the serpin classification are also available at the following web site: <http://en.wikipedia.org/wiki/Serpins>.

Structural Features

As shown in Fig. 2b for α_1 -antitrypsin, upon cleavage of the RCL, the serpin adopt quickly a more stable conformation by insertion of the RCL into the β -strand series. This property is essential to the irreversible suicide substrate inhibitory mechanism of serpins. In the inhibitory pathway, the proteinase forms a non-covalent Michaelis-like complex (Fig. 2c) through interactions with residues flanking the scissile bond (P1–P1'). Attack of the active site serine on the scissile bond leads to a covalent ester linkage between highly reactive Ser residue of the proteinase and the backbone carbonyl of the P1 residue and cleavage of the peptide bond. It is likely that only at this stage, with removal of the restraint, does the RCL start to insert into β -sheets and transport the covalently bound proteinase with it. Upon complete loop insertion, the proteinase is translocated to the distal side of the serpin (Fig. 2d). This translocation induced an important distortion of the proteinase which became unable to complete the catalytic process. The energy needed to effect the distortion may come from the much greater stability of the cleaved loop-inserted conformation compared with the native-like conformation.

Kinetic Analysis of Protease-serpin Interactions

Given the general mechanisms reported so far, kinetic values are determined under the assumption that inhibition is irreversible. In such case, the inhibition constant (K_i) is of no interest and will bring no information about the enzyme-serpin interaction. The major macroscopic parameters that define the effectiveness of serpin inhibition of a particular target protease are the stoichiometry of interaction (SI) and the apparent second order rate constant of inhibition (k_{ass}). Another parameter can be the stability of the covalent complex (vary from few seconds to several weeks (Bieth, 1980) during the inhibition process and often revealed by SDS-PAGE analysis, the complex being stable in the presence of SDS even after heating in boiling water.

SI was generally determined by titration of the enzyme with increasing amounts of pre-titrated inhibitor (illustrated in Fig. 10 for the titration of trypsin and thrombin by purified antithrombin III).

Practically, the apparent association rate constant (k_{app}) was measured according to the discontinuous method for enzymes interacting slowly with the serpins ($k_{\text{ass}} \leq 10^4$

$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Horvath et al., 2011) and the association rate constant then determined according to Equation (1):

$$K_{\text{ass}} = k_{\text{app}} * S I \quad (1)$$

Otherwise, for rapid enzyme/serpin interaction, the continuous method was used to determine the Apparent Association rate constant (k_{app}) and the association rate constant (k_{ass}) was then obtained from Equation (2):

$$K_{\text{ass}} = k_{\text{app}}(1 + [S]/K_m)*S I \quad (2)$$

where [S] is the substrate concentration used for activity measurement, K_m the Michaelis constant characterizing the affinity of the protease towards the substrate and SI the stoichiometry of interaction.

CHARACTERIZATION OF BOV-SERPINA3-1 AND A3-3

Stoichiometry of Interaction with Inhibited Proteases

The stoichiometry of interaction was determined by titration of the target enzymes (HLE, trypsin, caspases 3 and 8) with increasing amounts of either Bov-SerpinA3-1 (Swiss Prot ID: [Q9TTE1](#)) or A3-3 (Swiss Prot ID: [Q3ZEJ6](#)) as in (Schechter and Plotnick, 2004). As shown in Table 1, total inhibition of trypsin and human leukocyte elastase was achieved using equimolar concentrations of either serpins suggesting a 1:1 interaction ratio.

Regarding caspases, analysis of the findings of Table 1 needs to remind that each molecule of caspases is a tetrameric structure comprising two associated moieties composed of a large and a small subunit, each moiety containing an active site, *i.e.* two active sites in each native caspase molecule. An equimolar interaction (1 mole of inhibitor per active site) was thus observed for the inhibition of caspase 3 by Bov-SerpinA3-1. Hence, for total inhibition of the caspase, one molecule of Bov-SerpinA3-1 must bind to each active site of caspase 3. In all other cases, namely inhibition of caspases 3 and 8 by Bov-SerpinA3-3 or inhibition of caspase 8 by Bov-SerpinA3-1, one mole of inhibitor inactivates simultaneously

Table 1 Stoichiometry of interaction of Bov-serpins with the target enzymes: Bovine pancreatic trypsin, Human Leukocyte Elastase (HLE), human recombinant caspases 3 and 8

	Stoichiometry of interaction (SI)	
	SerpinA3-1	SerpinA3-3
Trypsin	1.01 ± 0.03	0.98 ± 0.01
HLE	1.04 ± 0.02	1.01 ± 0.03
Caspase 3 ⁽¹⁾	1.01 ± 0.07	0.55 ± 0.07
Caspase 8 ⁽¹⁾	0.49 ± 0.09	0.51 ± 0.06

⁽¹⁾SI = [I]/[Caspase active sites].

the two active sites (0.5 mole of inhibitor per active site), suggesting that association of the inhibitor to one of the two active sites induces a sufficient allosteric conformational change of the tetrameric native protease to make the second site unable to bind substrates.

Association Rate Constant toward Different Cysteine and Serine Proteases

Regarding this constant, we must keep in mind that k_{ass} values $\leq 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ are of no physiological significance. In this study, association rate constant towards a large set of serine and cysteine proteases was therefore determined for both serpins according to (Schechter and Plotnick, 2004; Horvath et al., 2011).

As depicted in Table 2, Bov-SerpinA3-1 and Bov-SerpinA3-3 showed a similar pattern towards the set of proteases tested. They were thus able to strongly inhibit elastase ($k_{\text{ass}} = 1.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) and trypsin ($k_{\text{ass}} = 6.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) whilst chymotrypsin and plasmin were only slightly inhibited and the k_{ass} values obtained for these two last enzymes are not of physiological significance (Tassy et al., 2005; Herrera-Mendez et al., 2006b). By contrast, no inhibition was detected against the other five serine proteases tested including cathepsin G, kallikrein, urokinase, plasminogen activator and thrombin.

As serpins are able to inhibit some cysteine proteases, Bov-SerpinA3-1 and A3-3 were tested against papain like enzymes including cathepsins B & L and papain itself and against calpains 1 and 2, two calcium dependent cysteine peptidases. Neither of these cysteine proteases was inhibited by the present serpins (Tassy et al., 2005; Herrera-Mendez et al., 2006b).

Bovine serpins were also tested against a group of cysteine peptidases called caspases. The first letter of the name «C» stands for the cysteine of the active site; «asp» defines the strict specificity of cleavage after an aspartic acid residue and *ase* is the suffix common to all enzymes. These are responsible of cell dismantling during apoptosis, a finely regulated cell death process and according to their function in the cell dying process; they were classified as initiator (caspases 8, 9 and 10) and effector (caspases 3, 6 and 7) caspases, initiator caspases being in charge of the limited proteolytic activation of effector enzymes. Caspase 8, an initiator caspase, and caspase 3, an effector caspase, are strongly inhibited by both serpins (Table 2) and k_{ass} values are in the range of 10^5 – $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ indicating that this inhibition is of high physiological significance (Herrera-Mendez et al., 2009).

Interestingly, these were the first mammalian serpins identified as strong inhibitor of human initiator and effector caspases and able to form SDS-stable complexes with these (Herrera-Mendez et al., 2009). The only one other serpin found to inhibit caspases is crmA (Cytokine response modifier A) isolated from cowpox virus. In infected cells, crmA is suspected to block the apoptotic process during multiplication of the virus (Stennicke et al., 2002; Dobo et al., 2006).

Ability of the Serpins to Form SDS-stable Complexes with Their Target Enzymes

Serpin inhibition of cysteine proteases proceeds according to the same trapping mechanism than for serine proteases (Swanson et al., 2007). Upon SDS-PAGE, we could therefore expect to identify the covalent complexes for all proteases shown to be strongly inhibited by Bov-SerpinA3

Table 2 Inhibitory pattern of bovSERPINA3-1 and A3-3 and association rate constant (k_{ass} in $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) against a large set of cysteine and serine proteases tested. (NI: no inhibition detected). In bold style are the proteases strongly inhibited by the serpins; in normal style are the proteases for which the inhibition is of no physiological significance; in italic style are the non-inhibited proteases

PROTEASES	Association rate constant (k_{ass}) ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)		
	bovSERPINA A3-1	bovSERPINA A3-3	
Serine Proteases	Trypsin	3.9×10^6	6.7×10^5
	Chymotrypsin	1.0×10^2	9.0×10^2
	Plasmin	1.8×10^3	2.7×10^3
	Elastase	2.4×10^7	1.3×10^6
	<i>Cathepsin G</i>	NI	NI
	<i>Kallikrein</i>	NI	NI
	<i>Urokinase</i>	NI	NI
	<i>Plasminogen activator</i>	NI	NI
	<i>Thrombin</i>	NI	NI
	<i>Papain</i>	NI	NI
	<i>Cathepsin B</i>	NI	NI
	<i>Cathepsin L</i>	NI	NI
Cysteine Proteases	<i>Calpains 1 & 2</i>	NI	NI
	Caspase 3	4.2×10^5	1.5×10^5
	Caspase 8	1.4×10^6	2.7×10^6

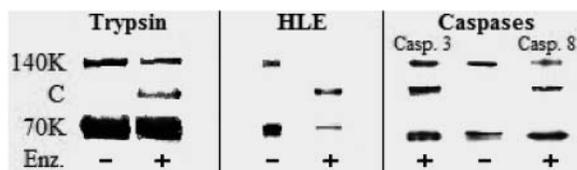


Figure 3 Covalent complexes upon SDS-PAGE between Bov-SerpinA3-1 and proteases as revealed by western blot, using the rabbit polyclonal antibody raised against this serpin (Herrera-Mendez et al., 2009). Similar findings were obtained with Bov-Serpin A3-3 (not shown). Note that the 140 kDa band is a dimer of the 70 kDa serpin (Tassy et al., 2005). C, band corresponding to the complex formed with the different target enzymes: trypsin, Human Leukocyte Elastase (HLE) and human recombinant caspases 3 and 8. (–) inhibitor alone; (+) inhibitor incubated with the target enzyme (Enz).

isoforms. As illustrated in Fig. 3 for Bov-SerpinA3-1, bovine serpins (70 kDa) are thus able to form SDS-Stable complexes (C) with bovine pancreatic trypsin, human leukocyte elastase, human caspase 3 (apoptosis effector caspase) and human caspase 8 (apoptosis initiator caspase) (Tassy et al., 2005; Herrera-Mendez et al., 2006b; Herrera-Mendez et al., 2009).

Regarding caspases 3 and 8, preincubation of these enzymes with Bov-SerpinA3-1 leads to an SDS-stable complex of about 100–110 kDa. According to the Mr value, the complexes would comprise the cleaved inhibitor (70 kDa) and the covalently bound caspase (30 kDa) transported to the distal pole of the serpin. The covalently bound caspase is very likely an heterodimeric moiety (with or without the small subunit) of the tetrameric molecule, the other moiety being very likely dissociated during heat denaturation of the sample in the presence of SDS. Further investigations are needed to clarify the exact mechanisms of the caspase/Bov-SerpinA3 complex formation and the behaviour of caspase subunits during complex formation (Herrera-Mendez et al., 2009). Note that in Fig. 3, the 140 kDa band observed for all peptidases corresponds to a dimer of the serpin as assessed by N-terminal sequence analysis (Tassy et al., 2005).

Cellular Localization and Tissue Distribution

Immunolocalization of Bov-SerpinA3-1 was performed on transverse sections of freshly excised adult bovine *Longissimus* muscle using a specific polyclonal rabbit antiserum. As depicted in Fig. 4a, the muscle serpin is highly concentrated between the plasma membrane and the myofibrils, whereas lower fluorescence intensity can be seen within the myofibrils, indicating that muscle serpin is exclusively intracellular with a preferential peripheral localization. No fluorescence was detected in the control sample for which the primary antibody was omitted. In primary myoblast in culture, the localization was essentially intracellular (see Fig. 4b).

Tissue distribution and content of Bov-SerpinA3-1 and other closely related serpins (see below) was assessed by ELISA in different bovine tissues and fluids including bovine

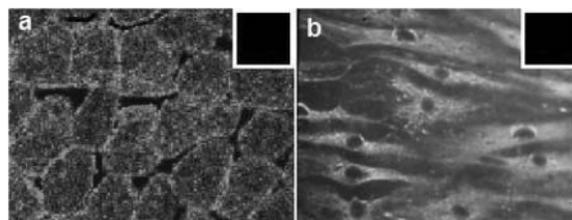


Figure 4 Cellular localization of Bov-SerpinA3-1 in transversal cuts of bovine skeletal muscle (a) and in primary bovine myoblast culture (b) using the rabbit polyclonal antibody raised against the purified serpin. Inserts of Figure 4a and 4b are control samples where the primary antibody has been omitted.

plasma, liver, kidney and bovine *diaphragma* muscle. According to the results presented in Table 3, this serpin is very abundant in plasma (≈ 1 mg/ml) as compared to liver ($14 \mu\text{g/g}$ wet tissue), kidney ($2 \mu\text{g/g}$ wet tissue) and muscle ($1 \mu\text{g/g}$ wet tissue). These caspase inhibiting serpins showed a wide distribution in bovine tissues and fluids and were also detected in all tissues of other animal species analysed (rat, mouse, lamb, pork, ...) including human.

Complexity of the Bov-Serpin A3 Family

Polymorphism of Bov-Serpin A3

In the first step of the purification procedure developed for Bov-SerpinA3-1, the crude muscle extract was run on a SP-Sephacrose column ($5 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$) and proteins were eluted using a NaCl gradient (Fig. 5a). Western blot analysis of the fractions collected revealed a cross-immunoreactivity with the antibody raised against the purified serpin of most if not all fractions (Fig. 5b). According to the result of Fig. 5b, the antibody recognized a series of proteins with different Mr suggesting that the Bov-SerpinA3 comprised different closely related members.

To confirm this assumption, pooled active fractions FI and FII obtained upon gel filtration of a muscle crude extract and identified in Fig. 1 were analyzed by 2D gel electrophoresis

Table 3 ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay) quantification of Bov-SerpinA3-1 in different bovine fluids and tissues. “Present NQ”, means that the serpin was detected by other methods but not quantified by ELISA (Tassy et al., 2005)

ELISA Quantification of Bov-SerpinA3-1	
Fluids/Tissues	[Bov-SerpinA3-1]
Plasma	1,0 mg/ml
Liver	$14 \mu\text{g/g}$ wet tissue
Kidney	$2,0 \mu\text{g/g}$ wet tissue
Muscle	$1,0 \mu\text{g/g}$ wet tissue
Thymus	Present NQ
Spleen	Present NQ

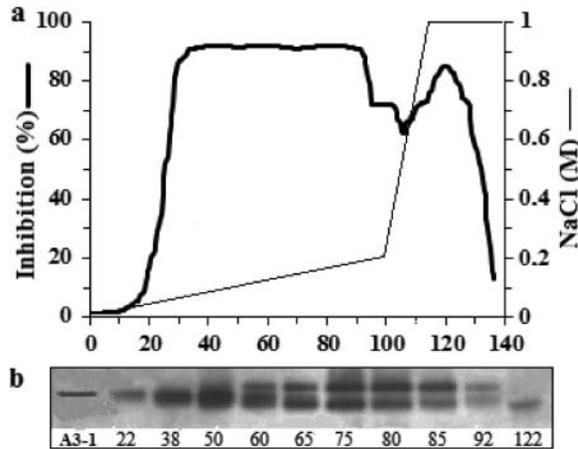


Figure 5 Polymorphism of the Bov-Serpin family as assessed by western blot: (a) Elution profile of a muscle crude extract from a SP-Sepharose column [18]. (b) Western blot analysis of the fractions eluted throughout the NaCl gradient (fraction number under each lane). Proteins were revealed using the rabbit polyclonal antibody raised against Bov-serpinA3-1. As a control the purified Bov-SerpinA3-1 (70 kDa) was loaded in the first well (A3-1).

and proteins revealed with the same anti-Bov-SerpinA3-1 antibody.

As assessed by western blot, 2D gel electrophoresis of the F1 fraction revealed a complex protein pattern with pI ranging between about pH 4 and 6.8 (Fig. 6a). It is impossible to determine the number of isoforms but the horizontal alignment of spots towards more acidic pH supports the presence of various degree of phosphorylation between these serpins (black line with close arrowhead). In addition some spots are distributed in a comma shape manner (arrows) suggesting that a large set of isoforms are glycosylated to various extent, a feature in good agreement with the overestimated Mr obtained by gel electrophoresis for both Bov-SerpinA3-1 and A3-3 (70 and 75 kDa versus 43-44 kDa for the Mr deduced from the protein sequences). This was confirmed recently by PNGase F (progressive removal of all N-glycans) treatment of recombinant

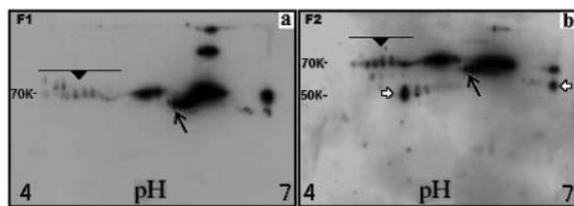


Figure 6 Polymorphism of the Bov-SERPINA3 family as assessed by 2D gel electrophoresis of fractions F1 and F2 identified in Figure 1. (a) 2D Gel analysis of the F1 fraction. (b) 2D gel analysis of fraction F2. Proteins were revealed by western blot using the rabbit polyclonal antibody raised against Bov-SerpinA3-1. In (a) and (b), the line with a down arrowhead indicates aligned spots corresponding to various degree of phosphorylation. Black arrows indicate a comma shape alignment of spots corresponding to different degree of glycosylation. In (b), open arrows designed new spots of slightly lower Mr not observed in the F1 fraction or more abundant in F2.

glycosylated Bov-SerpinA3-3 produced and purified from *S. cerevisiae* (Blanchet et al., 2012). Such treatment revealed six states of glycosylation corresponding to six different forms of different Mr separated by SDS-PAGE. A similar finding was obtained with purified Bov-SerpinA3-1 (not shown). These results are in good agreement with the five N-glycosylation sites identified in the sequence of this serpin (Herrera-Mendez et al., 2006b).

As compared with fraction F1, fraction F2 shows a wholly similar protein pattern with some additional spots of lower Mr (open arrows in Fig. 6b). To conclude, all findings obtained so far emphasized the large molecular diversity of the bovine serpinA3 family which led us to identify the genes encoding these proteins in bovine genome.

Genomic Organization of the Bovine SerpinA3 Genes

Clustering of serpin genes frequently occurs in the genome of human and other animal species. In human, the chromosome 14q32 cluster comprised several serpins genes, encoding structurally related proteins with very diverse functions including SERPINA1 (α_1 -antitrypsin), SERPINA3 (α_1 -antichymotrypsin), SERPINA5 (PCI, protein C inhibitor), SERPINA9 (centerin), SERPINA10 (ZPI, protein Z-dependent protease inhibitor), SERPINA11 (not characterized yet) as well as SERPINA4 (kallistatin precursor) (Billingsley et al., 1993).

In mouse, 14 genes mapped on chromosome 12F1 cluster were identified and encoded for closely related serpins of the serpinA3 family (Forsyth et al., 2003). Similarly, 6 genes encoding serpinA3-like were mapped in rat on chromosome 6q32 cluster (Horvath et al., 2004) whereas in pork, 6 similar genes were mapped on chromosome 7q23-q26 cluster (Musilova et al., 1995; Archibald et al., 1996).

What about SERPINA3 like serpins' genes in bovine?

Based on the first sequence available for Bov-SerpinA3-1 and A3-3 (Herrera-Mendez et al., 2006b) several probes were designed and used to screen for similar genes in the bovine genome. A cluster of eight genes and one pseudogene sharing a high degree of identity and the same structural organization (5 exons and 4 introns) was characterized (Pelissier et al., 2008). Bovine SERPINA3 genes were localized by radiation hybrid mapping on 21q24 and only spanned over 235 Kilo bases. For all these genes, we proposed a new nomenclature from SERPINA3-1 to SERPINA3-8. They share approximately 70% of identity with the human SERPINA3 (α_1 -antichymotrypsin) homologue. Preliminary expression analyses of these bovSERPINA3s showed different tissue-specific patterns and diverse states of glycosylation and phosphorylation a finding in good agreement with the tissue distribution and the polymorphism of the Bov-SerpinA3-like assessed at the protein level by different approaches. Hence we concluded that the bovine SERPINA3 family comprised at least eight different proteins members and probably more with regards to their variable degree of post-translational modifications (various degrees of glycosylation and of phosphorylation) (see Fig. 6).

	1	10	20	30	40	50
a						
BovSERPINA3-1	. E E G T E G A A A T G I S M E R T I L R I I V R V N R P F L I A I V L K D T Q S I I F L G K V T N P S E A					
BovSERPINA3-3	. E E G T E G A A A T G I G I E R T F L R I I V R V N R P F L I A V V L K D T Q S I I F L G K V T N P S E A					
b						
BovSERPINA3-2	. E E G T E G V A A T G I G I E R T F L R I I V R V N R P F L I A V V L K D T Q S I I F L G K V T N P S E A					
BovSERPINA3-4	. E E G T E G A A A T G I G I E R T F L R I I V R V N R P F L I A V V L K D T Q S I I F L G K V T N P S E A					
BovSERPINA3-5	. E E G T E G A A A T G I G I E R T F L R I I V R V N R P F L I A V V L K D T Q S I I F L G K V T N P S E A					
BovSERPINA3-6	. E E G T E G A A A T G I G I E R T F L R I I V R V N R P F L I A V V L K D T Q S I I F L G K V T N P S E A					
c						
BovSERPINA3-7	. E E G T E G A A V T A V V M A T S S L L H T L T V S F N R P F L L S I F C K E T Q S I I F L G K V T N P K E A					
BovSERPINA3-8	. E E G T E G A A A T G V K V G I T S I N N H I P L S F N R P F L I A I V L K D T Q S I I F L G K V T N P S Q A					

Figure 7 Alignment of RCL sequences of bovSERPINA3-1 to bovSERPINA3-8 obtained from coding gene sequences (Pelissier et al., 2008). (a) Reactive Centre Loop (RCL) sequences of bovSERPINA3-1 and A3-3 used throughout this work. (b) RCL sequence with highest similarities with bovSERPINA3-1. (c) RCL sequence of the most divergent bovSERPINA3-7 and A3-8. Residues in white bold type indicate P1 residues for trypsin (Arg¹⁶) and putative P1 residue for caspases 3 and 8 (Asp³⁷ for A3-1 to A3-6; Glu³⁹ and Asp³⁹ for A3-7 and A3-8).

Comparative RCL Sequences and Potential Enzyme Targets

As mentioned above, the sequence of the RCL defines the enzyme specificity pattern of each serpin. Comparison of the RCL sequences of the eight proteins encoded by the genes mapped on bovine chromosome 21 provides additional information about their structural and functional relationship. According to the RCL sequences depicted in Fig. 7, two subgroups can be identified on the basis of their sequence homology. The first one would comprise Bov-SerpinA3-1 to A3-6 which contain an Arg (white on black bold letter R) residue at position 16 of the RCL and a Thr residues at position 17 (bold underlined T), two amino acid residues susceptible to explain their ability to inhibit strongly trypsin and elastase. The second group would comprise the two last serpins, namely Bov-SerpinA3-7 and A3-8, which have no Arg residues in similar position and would be unable to inhibit trypsin. By contrast, they both exhibit a Thr residue at position 16 and 17 and a Ser residue at position 17 and 18, respectively, suggesting that they will be able to inhibit elastase. Position of the P1 residues identified as preferential cleavage sites for trypsin and elastase agrees well with the supposed invariable RCL length value of about 17 amino acids.

As suggested in their name, caspases cleaved polypeptides essentially at the carboxyl side of Asp residues. No other potential P1 residues are actually known. On the other hand we found that purified Bov-SerpinA3-1 and A3-3 are strong inhibitors of caspases 3 and 8 ($k_{\text{ass}} > 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). The only one Asp residue in Bov-SerpinA3-1 to A3-6 RCL susceptible to be targeted by both caspases is Asp³⁷ is far beyond the 17th residue corresponding to the maximum length requested for serpin efficiency. Bov-SerpinA3-7 contains no Asp residue in its RCL while one Asp residue is observed at position 39 in its homologue Bov-SerpinA3-8. These observations strongly suggest that Bov-SerpinA3-1 to A3-6 would be able to inhibit caspases and to form SDS-stable complexes with them. Whether Bov-SerpinA3-7 will not be able to inhibit caspases since no Asp residue can be found in the RCL sequence, the ability of Bov-SerpinA3-8 to inhibit these cysteine tetrameric proteases would seem possible but this assumption needs to be tested experimentally. By contrast, these last serpins are very likely able to inhibit elastase for which the P1 residue would be very likely Thr at position 16 for Bov-SerpinA3-7 and 17 for Bov-SerpinA3-8.

Regarding caspases, the present findings are therefore in total contradiction with the RCL length invariance of serpins established with various monomeric targeted serine proteases (trypsin, elastase...). Caspases are tetrameric cysteine proteases containing two active sites and whether the rule can be different for serpin interaction with these much larger proteases is questionable and calls for further clarification.

Possible Biological Functions of Bov-SERPINA3

Because of their ability to strongly inhibit caspases, two functions will be considered here because of the potential implications of cell death in these processes but this list is obviously not exhaustive and needs refinement. The first is of course apoptosis (see schematic diagram of the major regulation point in Fig. 8) which is the primary process of concern with regards to the presently discovered function for these inhibitors (Gagaoua et al., 2012). The second is the differentiation of muscle cells for which a resistance to cell death has often been reported in the first differentiation stages corresponding to the proliferation and confluence of myoblast. Cell survival is a prerequisite for differentiating primary myoblast (Lamkanfi et al., 2007), and the present caspases inhibiting serpins could be a potential candidate for such a function through total inhibition of caspases.

Bov-SerpinA3: A New Control Point of Apoptosis in Mammals

Since the 80's, it is well established that for most proteolytic systems, if not all, natural peptidase inhibitors constitute the major tool for controlling their biological activity. Regarding caspases, the first regulation level involves the conversion of zymogens to their active forms in response to inflammatory or apoptotic stimuli. This conversion is generally ensured by association of the peptidases with specified protein activator complexes. The second level of regulation involves the specific inhibition of active caspases by natural inhibitors. To date, members of three protein families have been found capable of ablating caspase activity in vitro and in vivo (Stennicke et al., 2002). One of these, the inhibitors of apoptosis protein (IAP) family regulates cellular apoptosis by direct caspase inhibition and is conserved from flies to humans (Deveraux

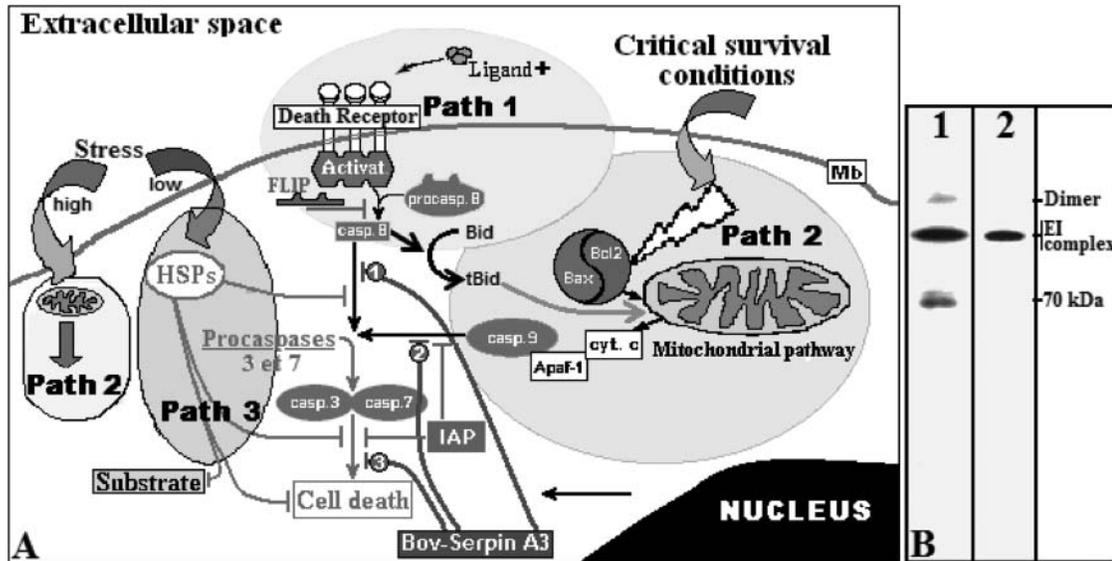


Figure 8 Schematic diagram of apoptosis regulation and complex detection in crude muscle extracts. (A) Schematic and simplified diagram summarizing the major regulation points of the apoptotic process (adapted from (Philchenkov, 2004)). With regards to the extrinsic pathway (**Path 1**), stimuli will bind to the death receptor inducing the activation of caspases 8 and 10 by association with their activator complexes (DISC or death-inducing signaling complex and CARD or caspase-recruitment domain). Besides the activation of effector caspases, caspase 8 will cleave Bid, a pro-apoptotic member of the Bcl2 protein family, which is at the cross between the intrinsic and extrinsic pathways. Cleaved Bid (tBid) will then initiate the contribution of mitochondria to the cell death process. Activation of caspase 8 by the activator complex can be lowered down by FLIP (FLICE inhibitory protein) a protein competing for binding to the activator complex. Activated caspase 8 will then in turn activate executioner caspases 3 and 7. The apoptotic status of the cell will be comforted by the release from mitochondria of diverse pro-apoptotic components including cytochrome c, a necessary member of the apoptosome complex responsible of the procaspase 9 activation. For more detailed explanations, see the review of (Ouali et al., 2006). The only one inhibitor of caspase and hence of apoptosis so far identified in mammals are IAPs (Inhibitor of apoptosis proteins) which targeted initiator caspase 9 and effector caspase 3 and 7 (O’Riordan et al., 2008). If these steps failed, the process will continue to its end and lead to cell death and dismantling. The new control pathway reported here, namely the pseudo-irreversible inhibition of caspase by dedicated serpins, affect different step of the apoptotic process. The first control point (1) is the inhibition of initiator caspases, i.e. caspase 8 and probably also caspase 10. The second (2) is the probable inhibition of caspase 9, another initiator caspase. The third and last point is the inhibition of caspase 3 and, according to recent findings, caspase 7. In the present diagram, we introduce a third path to emphasize the major role of Heat Shock Proteins (HSPs). These proteins are generally expressed as soon as a cell undergoes a stress to preserve all cell functions by protecting their targets proteins from any structural and/or activity loss. HSPs may have therefore diverse anti-apoptotic actions by protecting the target protein substrates from hydrolysis by caspases and other any proteolytic system of concern and by forming complexes with diverse caspases at different stage of the process thus hindering their function (Arrigo, 2005; Beere, 2005). (B), Western blot analysis of at death muscle extracts using a rabbit anti-Bov-SerpinA3-1 (lane 1) and anti-caspase 3 polyclonal antibody (lane 2). The complex is revealed with both antibodies emphasizing the caspase activation in postmortem muscle and the caspase-serpin complex formation.

and Reed, 1999). They are potent inhibitors of caspase 3, 7 and 9 (Dean et al., 2007), and they are the only one to be expressed in mammal cells and tissues. In addition to these endogenous regulators there are virally encoded inhibitors – cowpox virus crmA and baculovirus p35 – that are produced early in infection to suppress caspase-mediated host responses (Cassens et al., 2003). Protease inhibitors generally work by preventing hydrolysis of substrate by the enzyme, and almost all natural protease inhibitors achieve this by steric hindering access of substrates to the catalytic centre of the protease. Usually, inhibitors dock onto the same sites as substrates on the enzyme surface. By contrast, caspase inhibition by IAPs does not use these conventional mechanisms. To achieve their goal, IAPs block substrate access to the peptidase active site without directly docking into substrate pockets on the enzyme surface allowing hydrolysis of small molecules substrates after IAP binding (Stennicke et al., 2002; Cassens et al., 2003).

It was therefore often thought that, for unknown reasons, cystatins or serpins do not seem to have been chosen for

endogenous caspase regulation in eukaryotic cells. This gap now seems to be filled with the results reported here and invalidating this statement. Indeed, all findings obtained in the present work clearly demonstrate that eukaryotic cells have in fact developed very efficient pseudo-irreversible caspase inhibitors belonging to the serpin family, a family of inhibitors well known to form pseudo-irreversible complexes with their target peptidases. In contrast to the cowpox virus crmA, they form SDS-stable serpin/caspases complexes both in vitro and in situ. Such a more radical inhibition of the caspases than IAPs is indeed essential and constitutes probably an absolute prerequisite for a strict and efficient regulation of apoptosis. Supporting the in vitro findings, caspase-serpin complexes can be detected in postmortem muscle excised just after death by western blot using anti-caspase and anti-serpins antibodies (Fig. 8B) stressing that caspase activation is completed in postmortem muscle in contrast to what has been suggested by some meat scientists. This probably explain why trypsin inhibitors quantified by titration in crude muscle extracts were

found to be a better predictor of ultimate meat tenderness than calpain 1 & 2 levels, calpastatin concentration and level of cysteine proteases inhibitors assessed through inhibition of a pre-titrated papain preparation (Zamora et al., 1996; Zamora et al., 2005). These serine protease inhibitors are mainly composed of cross-class inhibitory serpins able to inhibit strongly and pseudo-irreversibly initiator and effector caspases as Bov-SerpinA3-1 to A3-6 and would be good candidates for accurate predictors of meat tenderness. Highest levels of serpins inhibiting caspases are thus observed in toughest meat (Zamora et al., 1996; Zamora et al., 2005).

Possible Role in Muscle Cells Differentiation

During the process of muscle development, myoblasts proliferate and then undergo differentiation, fusing to form multinucleated myotubes. During the proliferating phase, it was suggested that myoblast are protected against cell death by different still unclear mechanisms. Some authors suggested that this protection is mediated by thrombin (Chinni et al., 1999), a trypsin-like serine peptidase expressed in muscle cells (Citron et al., 1997) and decreasing significantly the number of apoptotic cells in culture performed in the presence of this peptidase (Chinni et al., 1999).

Because bovine SERPINA3s are strong inhibitors of initiator and executioner caspases, their expression in differentiating primary myoblasts was followed by immunohistochemistry using the anti-Bov-SerpinA3-1 antibody. As depicted in Fig. 9, bovine SERPINA3s are expressed in proliferating (Fig. 9a) and in confluent (Fig. 9b) myoblasts but not in differentiated myotubes (Fig. 9c). In Fig. 9c, we often observed a reminiscent fluorescence which can be very likely ascribed to myotubes which are still under differentiation. According to (Chinni et al., 1999), myoblasts exposed to thrombin, for a

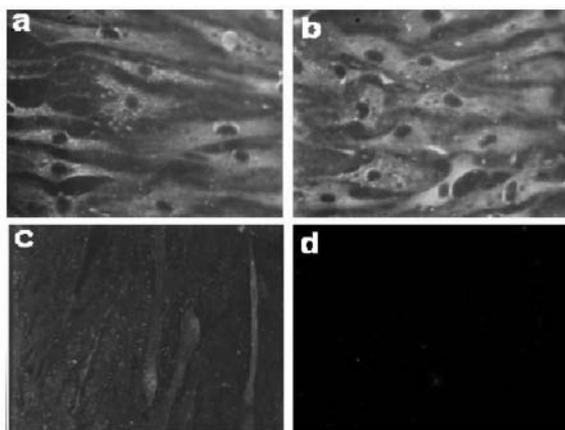


Figure 9 Expression of Bov-SerpinA3 during primary myoblast differentiation. (a) proliferating myoblasts; (b) confluent myoblasts; (c) differentiated myoblasts (myotube); (d) control with omitted primary antibody. Expression of these serpins was revealed by immunohistochemistry using the polyclonal rabbit antibody raised against Bov-SerpinA3-1 as the primary antibody and a FITC labelled anti-rabbit IgG as the secondary antibody.

very short period, accumulated apoptosis inhibitory activity preventing cell death for the subsequent growth in the absence of thrombin suggesting that the protective action of thrombin could be effected through the synthesis of an unknown apoptosis inhibitory factor and more especially by serpins inhibiting caspases.

This observation therefore supports a real contribution of bovSERPINA3s to cell survival in differentiating primary myoblast, a result in good agreement with the expression pattern of these serpins during the different steps of the process.

CHARACTERIZATION OF ANTITHROMBIN III

Antithrombin III was purified from bovine skeletal muscle as previously described (Herrera-Mendez et al., 2010) and characterized. Identity of the purified serpin was first assessed using different technical approaches including N-terminal sequencing, immunoblotting using a polyclonal antibody raised against human antithrombin III and mass spectrometry peptide map. Primary sequence analysis using the Edman procedure provided the following sequence: H¹RSPVEDVC-TAKPR¹⁴. Similarity searches in databanks with this N-terminal sequence were carried out using BlastP2 (Bork Group, EMBL, Heidelberg). This sequence showed 100% similarity with the cDNA deduced sequence of the mature bovine AT-III (SwisProt accession number: P41361), a serpin inhibiting specifically thrombin. This identity was further confirmed by the strong labeling of the purified muscle AT-III by a polyclonal antibody raised against human AT-III and by mass spectrometry trypsin peptide map (Herrera-Mendez et al., 2010). Muscle AT-III was then characterized for its enzyme specificity pattern through association rate constant determination, its cellular localization and the expression of mRNA transcripts in both muscle tissue and differentiating primary myoblast in culture (paper in preparation).

Stoichiometry of Interaction and SDS-stable Complexes with the Target Enzymes

To assess the stoichiometry of interaction (SI), trypsin (7 nM) and thrombin (9 nM) were titrated with the purified AT-III in a total volume of 200 μ L. As shown in Fig. 10a, complete trypsin and thrombin inhibition was achieved for AT-III concentrations of 7.09 nM (mean \pm SD for five independent determinations, 7.03 \pm 0.04 nM), and 9.10 nM, (mean \pm SD for five independent determinations, 9.05 \pm 0.06 nM) respectively. These results stressed forward that AT-III inhibition of both trypsin and thrombin occurs through a 1:1 enzyme/inhibitor ratio (SI = 1). Hence, concentration of AT-III was routinely determined by titration of trypsin solution of known concentration.

This finding was comforted by the formation of a 1:1 complex upon SDS-PAGE (Fig. 10b). In contrast to Bov-

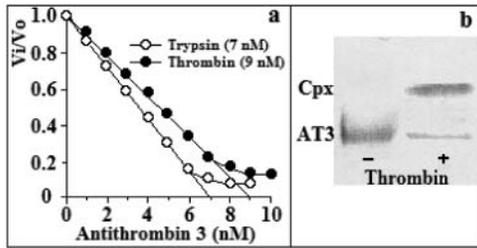


Figure 10 Stoichiometry of interaction of bovine ATIII with trypsin and thrombin (a) and thrombin/serpin complex formation upon SDS-PAGE analysis of the enzyme/inhibitor mixture.

SerpinA3-1 no dimer was obtained in such conditions, a result agreeing well with the absence of dimers for some isoform of Bov-SerpinA3 (Tassy et al., 2005) and other serpins (Gettins, 2002) including the cowpox virus crmA (Dobo et al., 2006).

Association Rate Constant toward Different Cysteine and Serine Proteases

Association rate constant towards a large set of cysteine and serine proteases was determined. According to the results depicted in Table 4, muscle AT-III inhibits strongly trypsin and thrombin and to a lesser extent plasmin and chymotrypsin. Note that no inhibition was observed against all cysteine proteases tested including papain, cathepsins B & L, calpains 1 & 2 and caspases 3 & 8 as well as against some other serine proteases (elastase, cathepsin G, Urokinase, plasminogen activator). Regarding thrombin addition of heparin caused a 100 fold increase in the association rate from 1.8×10^5 to 2.3×10^7 $M^{-1}s^{-1}$.

Cellular Localization and Transcripts Expression

As thrombin is expressed in muscle cells (Citron et al., 1997), the expression of its specific inhibitor antithrombin III (AT-III) could be expected an assumption supported by the

Table 4 Inhibitory pattern of bovine ATIII and association rate constant (k_{ass} in $M^{-1}s^{-1}$) against a large set of cysteine and serine proteases tested. In italic style are the non-inhibited proteases (NI)

	Cofactor	k_{ass} ($M^{-1}s^{-1}$)
Trypsin	none	5.0×10^5
Chymotrypsin	none	6.8×10^4
Plasmin	none	1.7×10^4
Thrombin	none	1.8×10^5
	Heparin ($5\mu M$)	2.3×10^7
<i>Elastase</i>	none	NI
<i>Cathepsin G</i>	none	NI
<i>Kallikrein</i>	none	NI
<i>Urokinase</i>	none	NI
<i>Plasminogen activator</i>	none	NI

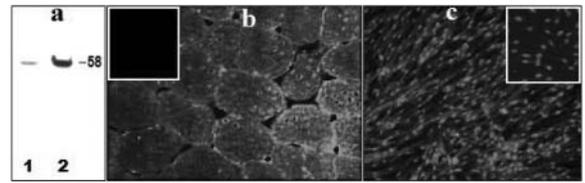


Figure 11 Expression of antithrombin III in muscle crude extracts and in muscle cells as assessed by western blot and immunohistochemistry. (a) Western blot analysis of a crude muscle extract (lane 1) and of purified AT-III (lane 2) using a rabbit polyclonal anti-AT3. (b) Immunolocalization of the bovine muscle AT III in bovine Diaphragma pedialis muscle using the same antibody (1/50) as the primary antibody and the FITC-labelled goat anti-rabbit IgG as the secondary antibody (1/500). (c) Immunolocalization of ATIII in differentiating primary bovine myoblast in culture in similar conditions than in (a). Cell nuclei are stained in red with the Hoechst method. Inserts in (b) and (c) are control samples in which the primary antibody was omitted.

immunohistocalization of this serpin in all fibers of mouse skeletal muscle (Businaro et al., 1995). The work carried out in our group intended to verify this hypothesis.

The presence of AT-III in bovine muscle was first assessed by analysis of crude muscle extracts by western blot using a polyclonal antibody raised against human AT-III and then by immuno-histochemistry with the same antibody. As shown in Fig. 11a, western blot analysis of crude muscle extracts subjected to SDS-PAGE always revealed one band with a Mr of about 58 kDa (Fig. 11a, lane 1) and running as the purified AT-III (Fig. 11a, lane 2). Immunohistochemical localization of AT-III was then carried out on transverse section of bovine *Diaphragma pedialis* muscle to confirm the presence of this protein within muscle fibers. As shown in Fig. 11b no fluorescence was detected in the extracellular space suggesting that AT-III is a constitutive intracellular protein of muscle cells and is very likely genetically expressed in these cells. Within muscle fibers, AT-III labeling seemed to be often highly concentrated in the vicinity of the plasma membrane as compared to the inside cytosolic fibers area. When the primary AT-III antibody was omitted, no labeling was detected. These findings are wholly similar to those of (Businaro et al., 1995) who localized three different serum protease inhibitors in mouse skeletal muscle including AT-III. To attest this statement, we then looked for the expression of antithrombin in differentiating myoblast in culture and the expression of mRNA in muscle tissue and in differentiating primary myoblast.

In developing muscle, thrombin increase the number of cells during myoblast proliferation (Kelvin et al., 1989; Suidan et al., 1996; Guttridge et al., 1997; Chinni et al., 1999) but delayed skeletal muscle myogenesis through inhibition of myoblast fusion (Suidan et al., 1996; Chinni et al., 1999). To test this statement and to comfort our previous findings supporting the presence of AT-III in muscle cells, the expression of this serpin was followed by immunohistochemistry in differentiating primary bovine myoblast cultures using a rabbit polyclonal antibody raised against human AT-III and revealed with a FITC conjugate goat anti-rabbit IgG as the secondary

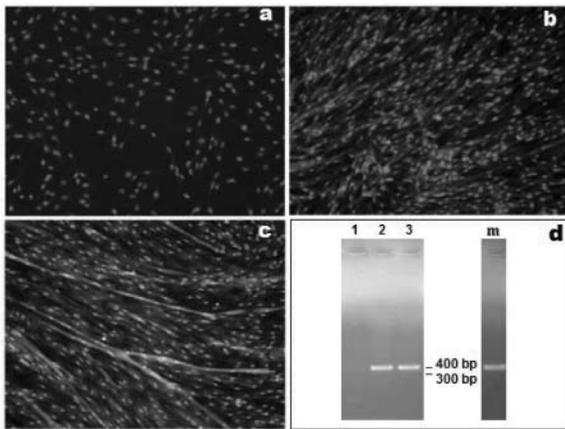


Figure 12 Expression of AT-III in differentiating primary bovine myoblasts and RT-PCR analysis of bovine AT-III mRNAs. (a) absence of expression of ATIII in proliferating primary bovine myoblast in culture (no fluorescence was observed). (b) expression of ATIII in confluent primary bovine myoblast in culture. (c) expression of AT-III. (c) expression of ATIII in growing myotubes. Note that cell nuclei were coloured in red using the Hoechst staining method. The antibody used was a rabbit polyclonal anti-AT3 diluted to 1/50. (d) RT-PCR analysis of total cells mRNAs prepared from proliferating myoblast (lane 1), confluent and fusing myoblast (lane 2) and growing myotubes (lane 3). Lane m showed the RT-PCR analysis of total mRNAs prepared from bovine muscle.

antibody. In all experiments carried out, the cell nuclei were stained in red using the Hoechst method. As depicted in Fig. 12a, proliferating myoblast showed no labeling indicative of the absence of this protein within muscle cells. By contrast, an intense green staining was observed in confluent myoblasts (Fig. 12b), fusing myoblasts and myotubes (Fig. 12c). Despite the common properties shared by Protease nexin-1 (PN-1 or SERPINE2) and AT-III, PN-1 does not cross-react immunologically with AT-III (Farrell et al., 1986). Hence it can be ascertained that the labeled protein in the myoblast culture is AT-III and not PN-I.

As plasma antithrombin III is synthesized in liver and then exported, liver PCR was used as positive control. Expression profile suggested by analyses of EST counts indicated that Antithrombin III is expressed in bovine liver (www.ncbi.nlm.gov). cDNAs obtained by reverse transcription from bovine liver and diaphragm were probed by nested PCR using specific sets of primers designed from the bovine AT-III gene sequence (GeneBank, AC : [NC_007319](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_007319)). The first set of primers corresponds to positions 4097 – 4116 (in exon 4) and 6553 – 6571 (in exon 5). The second set of primers were overlapping and designed 7 bases downstream and must amplified a 2463 bp fragment from genomic DNA and a 389 bp fragment from cDNA.

As indicated in Fig. 12d, *lane m*, a nested fragment of approximately 400 bp was generated with liver and diaphragm cDNAs. The PCR conditions don't allow to amplify long fragments, superior to 2000 bp on genomic DNA. Upon direct sequencing, a complete identity between sequences of the amplified AT-III cDNA (NM_001034698) was found

certifying that the bovine gene is effectively transcribed in this muscle.

As observed before on differentiating primary muscle cultured cells, AT-III is expressed when thrombin must be inactivated to allow the myoblast-myotube transition. The chronological expression of AT-III in muscle cells was confirmed by total RNA analysis, with the same probes than indicated above for skeletal muscle RNA, where mRNA transcripts are only found in the late stages of myoblast differentiation (confluence and fusion: Fig. 12d, lane 2) and in myotubes (Fig. 12d, lane 3) but not in proliferating myoblasts (Fig. 12d, lane 1).

Taken together, these findings stressed the expression of AT-III in muscle cells and support that this serpin would be the primary regulator of thrombin activity in muscle, a function often wrongly ascribed to protease nexin-1 (Rosenberg and Damus, 1973; Baker et al., 1980).

Biological Functions in Living and Postmortem Muscle

Besides the major role of thrombin in the vascular system reviewed by (Fenton, 1986; Mann, 1999), several extra-vascular functions have been reported since the 80's especially in the nervous system and in skeletal muscle. Regarding the nervous system, thrombin is assumed to modulate the shape of astrocytes (Cavanaugh et al., 1990; Nelson and Siman, 1990) and to mediate neurite retraction in neuronal cells (Gurwitz and Cunningham, 1988; Grand et al., 1989; Suidan et al., 1992; Jalink and Moolenaar, 1992). In muscle, thrombin is synthesized by muscle cells (Citron et al., 1997) and acts locally by contributing to synapse remodeling and elimination at the neuromuscular junction (Liu et al., 1994; Zoubine et al., 1996). Its activation at the membrane level by the thrombin activator complex is strictly dependent on the translocation of phosphatidylserine phospholipids from the inner leaflet of the plasma membrane to the outer leaflet (Majumder et al., 2005) through the action of diverse translocases (Bever et al., 1996). In postmortem muscle, externalization of phosphatidylserine, an early hallmark of apoptosis, will trigger the activation of thrombin which will in turn rapidly disconnect nerve from muscle cells, a feature supported by the prompt *postmortem* decrease in the efficiency of low-voltage electrical stimulation which uses only the nervous system for the electrical field conduction (Ouali et al., 2006; Herrera-Mendez et al., 2010). Therefore, thrombin might contribute efficiently to isolate dying cell from neighboring ones and from any other external signals, a major hallmark event of apoptotic cells.

In addition to its function in synapse plasticity, thrombin plays a major role in muscle cells differentiation. Thrombin thus increases the number of cells during myoblast proliferation but delayed skeletal muscle myogenesis through inhibition of myoblast fusion (Kelvin et al., 1989; Suidan et al., 1996; Guttridge et al., 1997; Chinni et al., 1999). Thrombin has been even considered as a survival factor for proliferating

myoblast through inhibition of apoptosis (Chinni et al., 1999). Our findings are in good agreement with the above two first functions of thrombin, namely myoblast proliferation enhancement and inhibition of myoblast fusion, thrombin/inhibitor ratio being high during proliferation (thrombin must be active) and low during the fusion phase (thrombin totally inhibited by AT-III) (See Fig. 12). Consideration of thrombin as a survival factor is however very doubtful since no direct evidence of any implication of this serine protease is actually available. Furthermore, survival of cells might be more probably ensured by inhibition of apoptosis through SERPINA3 like serpins which are able to inhibit pseudo-irreversibly caspases and in turn block the cell dying process (see above).

SERINE PROTEASE INHIBITORS FROM THE F3 FRACTION

Characterization of the serine protease inhibitors from this fraction is just starting and only preliminary results will be presented hereafter. From this fraction we previously purified and characterized a low Mr cysteine protease inhibitor binding tightly to cathepsin H ($k_{\text{ass}} \approx 3.7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) and, though to a lower extent, cathepsin B (Bige et al., 1985).

Regarding serine proteinase inhibitors, two low Mr inhibitors designed spi-1 and spi-2 were purified to homogeneity (Fig. 13a). Both are thermostable (stable between 40 and 90°C) and resistant to acidic and alkaline pH from 3 to 10. Spi-1 exhibits a Mr of 14.3 kDa and a pI value of 6.8 whereas spi-2 shows a Mr of 11.4 kDa and a pI value of 6.2 (Fig. 13b).

Both spi-1 and spi-2 are unable to inhibit all cysteine proteases tested including papain, cathepsins H, B and L as well as caspase 3. In contrast they can inhibit trypsin and, though to a lesser extent, chymotrypsin (Fig. 14a and b).

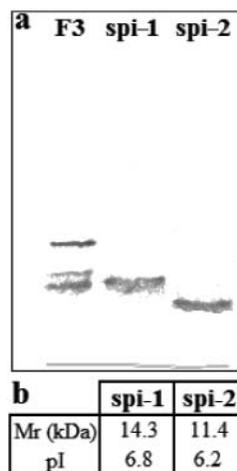


Figure 13 (a) Analysis by SDS-PAGE of total fraction FIII (see Figure 1) and of purified serine protease inhibitors 1 (spi-1) and 2 (spi-2). Proteins were revealed by silver staining. (b) Molecular mass (Mr) and isoelectrical point (pI) of spi-1 and spi-2.

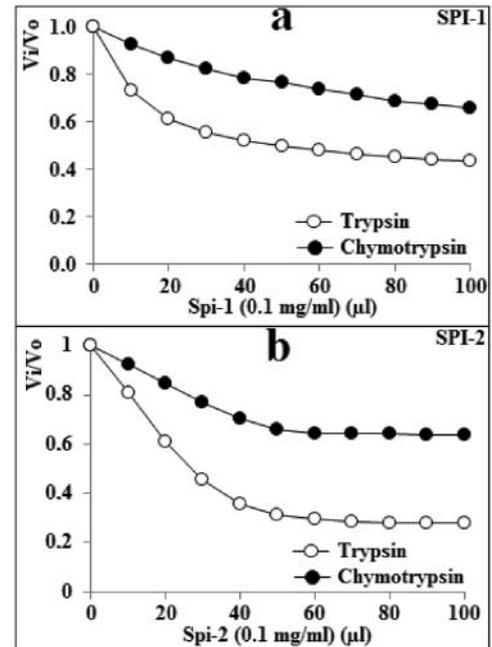


Figure 14 Inhibition profile of trypsin ($\approx 20 \text{ nM}$) and chymotrypsin ($\approx 20 \text{ nM}$) by spi-1 and spi-2.

Much remains to be learned about these two low Mr spi and investigations are under progress to characterize their interaction with different serine proteases, to identify them at the protein level by mass spectrometry and to determine the association rate with potential target proteases.

DISCUSSION-CONCLUSION

Serine proteases were for a long time an enigma in meat science (for review, see (Ouali, 1990; Sentandreu et al., 2002). These included proteasome, first described by (Orlowski and Wilk, 1981) which also exhibits activities of the serine protease type. This proteolytic complex was shown to reproduce changes occurring in postmortem muscle and could contribute significantly to intracellular protein degradation and, hence, to meat tenderization (Dutaud et al., 2006). Whether knowledge about the proteasome grew very fast in the next years, for other serine proteases, things were much less clear.

In the 1980's, serine proteases were first considered as only present in mast cells located in the extracellular matrix. As a result, it was suggested that they have no function in the meat tenderizing process. Later on, several reports suggested that some of them are located within muscle cells (Stauber et al., 1983a). Concomitantly these authors localized serine protease inhibitors within muscle cells (Stauber et al., 1983b). In 1986, we fractionated a series of inhibitors with a high affinity towards diverse serine proteases and located them within muscle cells (Ouali et al., 1986). It was then clear that muscle cells contain serine proteases together with their inhibitors and this

was strengthened by the subsequent identification of some of them at the gene, transcripts or protein levels, including kallikrein, thrombin, plasmin, protease nexin 1, plasminogen activator inhibitor or PAI, antithrombin III, kallistatin ... (reviewed in (Sentandreu et al., 2002).

The present report provides some answers to the numerous questions about serine proteases and their inhibitors. The high Mr fractions (F1 and F2) thus comprised predominantly cross-class inhibitory serpins able to inhibit serine and cysteine proteases and more specially caspases, a group of cysteine proteases orchestrating the demolition phase of apoptosis (Taylor et al., 2008). Taken together, these investigations suggest that there exists very likely a degree of compensation and redundancy within this serpin family wholly comparable to that reported for the set of caspases identified so far (Fuentes-Prior and Salvesen, 2004). The high Mr Fractions also contain antithrombin III, another serpin inhibiting strongly thrombin in an heparin dependent manner and trypsin. All these protease have essential function in the apoptotic process, thrombin contributing to isolate the dying cells from the nervous system and caspases targeting several hundred proteins and primarily proteins from the cytoskeletal including actin of the transversal filaments, integrin to which transversal filaments of the M line bind, dystrophin, a protein of the sarcoglycan complex designed costamere to which transversal filaments of the Z-line are bound, laminins, a group of proteins ensuring the connection of costameres and integrins to the extracellular matrix, ...and others. Note that the high Mr fraction contains also a series of cysteine proteases inhibitors unable to inhibit serine proteases and not yet characterized (Ouali et al., 1995). Regarding the serine protease inhibitors purified from the F3 fraction, the reported results are preliminary findings and further investigations are needed in order to identify these protein inhibitors and their potential target proteases (Becila et al., 2010).

We recently hypothesized that after death, muscle will engage in the cell death program with apoptosis rather than necrosis being the probable candidate (Ouali et al., 2006; (Herrera-Mendez et al., 2006a). This hypothesis was confirmed more recently by (Ouali et al., 2007; Becila et al., 2010) who provide evidence of cell shrinkage starting few minutes after death and of the concomitant rapid actin degradation, a major protein of the transversal cytoskeletal filaments binding to the costameres and to the integrins, two findings supporting the onset of apoptosis immediately after animal death. In a recent review, (Kemp and Parr, 2012) emphasized this hypothesis and give a large set of evidence supporting it. The observation of a caspase 3/serpin complex in muscle extracts definitely ascertains that caspase 3 is totally active in postmortem muscle excised within one hour after death and, consequently, that muscle cells are already engaged in apoptosis.

However, despite the prominent progress in that domain, much remain to be done if we would expect to better understand the onset and progress of apoptosis in postmortem

muscle and how the cell provide enough energy for the completion of that process. This will be a prerequisite to the identification of reliable biological markers of meat tenderness we are looking for since years.

ACKNOWLEDGMENTS

Thanks to the French and Algerian government.

FUNDING

This work would have not been possible without the Partenariat Hubert Curien (Franco-Algerian TASSILI project) which allowed regular visit to our laboratory of our colleagues from the University of Constantine (Algeria) during the four last years and funded the consumables.

REFERENCES

- Archibald, A. L., Couperwhite, S., Mellink, C. H., Lahbib-Mansais, Y. and Gellin, J. (1996). Porcine alpha-1-antitrypsin (PI): cDNA sequence, polymorphism and assignment to chromosome 7q24- > q26. *Anim. Genet.* **27**:85–89.
- Arrigo, A. P. (2005). Heat shock proteins as molecular chaperones. *M S-Med. Sci.* **21**:619–625.
- Baker, J. B., Low, D. A., Simmer, R. L. and Cunningham, D. D. (1980). Protease-nexin: A cellular component that links thrombin and plasminogen activator and mediates their binding to cells. *Cell.* **21**:37–45.
- Becila, S., Herrera-Mendez, C. H., Coulis, G., Labas, R., Astruc, T., Picard, B., Boudjellal, A., Pelissier, P., Bremaud, L. and Ouali, A. (2010). Postmortem muscle cells die through apoptosis. *Eur. Food Res. Technol.* **231**:485–493.
- Beere, H. M. (2005). Death versus survival: Functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *J. Clin. Invest.* **115**:2633–2639.
- Bevens, E. M., Comfurius, P. and Zwaal, R. F. (1996). Regulatory mechanisms in maintenance and modulation of transmembrane lipid asymmetry: Pathophysiological implications. *Lupus.* **5**:480–487.
- Bieth, J. G. (1980). Pathophysiological interpretation of kinetic constants of protease inhibitors. *Bull. Eur. Physiopathol. Respir.* **16**:183–197.
- Bige, L., Ouali, A. and Valin, C. (1985). Purification and characterization of a low molecular weight cysteine proteinase inhibitor from bovine muscle. *Biochim. Biophys. Acta.* **843**:269–275.
- Billingsley, G. D., Walter, M. A., Hammond, G. L. and Cox, D. W. (1993). Physical mapping of four serpin genes: Alpha 1-antitrypsin, alpha 1-antichymotrypsin, corticosteroid-binding globulin, and protein C inhibitor, within a 280-kb region on chromosome I4q32.1. *Am. J. Hum. Genet.* **52**:343–353.
- Blanchet, X., Pere-Brissaud, A., Duprat, N., Pinault, E., Delourme, D., Ouali, A., Combet, C., Maftah, A., Pelissier, P. and Bremaud, L. (2012). Mutagenesis of the bovSERPINA3-3 demonstrates the requirement of aspartate-371 for intermolecular interaction and formation of dimers. *Protein Sci.* **21**: 977–986.
- Businaro, R., Nori, S. L., Toesca, A., De Renzis, G., Ortolani, F., De Santis, E. and Fumagalli, L. (1995). Immunohistochemical detection of three serum protease inhibitors in mouse skeletal muscle by confocal laser scanning microscopy. *Ital. J. Anat. Embryol.* **100** Suppl 1:123–130.
- Cassens, U., Lewinski, G., Samraj, A. K., von Bernuth, H., Baust, H., Khazaie, K. and Los, M. (2003). Viral modulation of cell death by inhibition of caspases. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* **51**:19–27.

- Cavanaugh, K. P., Gurwitz, D., Cunningham, D. D. and Bradshaw, R. A. (1990). Reciprocal modulation of astrocyte stellation by thrombin and protease nexin-1. *J. Neurochem.* **54**:1735–1743.
- Chinni, C., de Niese, M. R., Tew, D. J., Jenkins, A. L., Bottomley, S. P. and Mackie, E. J. (1999). Thrombin, a survival factor for cultured myoblasts. *J. Biol. Chem.* **274**:9169–9174.
- Citron, B. A., Smirnova, I. V., Zoubine, M. N. and Festoff, B. W. (1997). Quantitative PCR analysis reveals novel expression of prothrombin mRNA and regulation of its levels in developing mouse muscle. *Thromb. Res.* **87**:303–313.
- De Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R. and Appelmans, F. (1955). Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem. J.* **60**:604–617.
- Dean, E. J., Ranson, M., Blackhall, F., Holt, S. V. and Dive, C. (2007). Novel therapeutic targets in lung cancer: Inhibitor of apoptosis proteins from laboratory to clinic. *Cancer Treat. Rev.* **33**:203–212.
- Deveraux, Q. L. and Reed, T. C. (1999). IAP family proteins - suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* **13**:239–252.
- Dobo, J., Swanson, R., Salvesen, G. S., Olson, S. T. and Gettins, P. G. (2006). Cytokine response modifier 4 inhibition of initiator caspases results in covalent complex formation and dissociation of the caspase tetramer. *J. Biol. Chem.* **281**:38781–38790.
- Dutaud, D., Aubry, L., Sentandreu, M. A. and Ouali, A. (2006). Bovine Muscle 20s Proteasome: I. Simple Purification Procedure and Enzymatic Characterization in Relation With Postmortem Conditions. *Meat. Sci.* **74**:337–344.
- Elliott, P. R., Pei, X. Y., Dafforn, T. R. and Lomas, D. A. (2000). Topography of a 2.0 Å structure of alpha1-antitrypsin reveals targets for rational drug design to prevent conformational disease. *Protein Sci.* **9**:1274–1281.
- Engh, R., Lobermann, H., Schneider, M., Wiegand, G., Huber, R. and Laurell, C. B. (1989). The S variant of human alpha 1-antitrypsin, structure and implications for function and metabolism. *Protein Eng.* **2**:407–415.
- Farrell, D. H., Van Nostrand, W. E. and Cunningham, D. D. (1986). A simple two-step purification of protease nexin. *Biochem. J.* **237**:907–912.
- Fenton, J. W. (1986). Thrombin. *Ann. NY Acad. Sci.* **485**:5–15.
- Forsyth, S., Horvath, A. and Coughlin, P. (2003). A review and comparison of the murine alpha1-antitrypsin and alpha1-antichymotrypsin multigene clusters with the human clade A serpins. *Genomics.* **81**:336–345.
- Fuentes-Prior, P. and Salvesen, G. S. (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem. J.* **384**:201–232.
- Gagaoua, M., Boudida, Y., Becila, S., Picard, B., Boudjellal, A., Sentandreu, M. A. and Ouali, A. (2012). New Caspases' inhibitors belonging to the serpin superfamily: A novel key control point of apoptosis in mammalian tissues. *Adv. Biosci. Biotechnol.* **3**(6):740–750.
- Gettins, P. G. (2002). Serpin structure, mechanism, and function. *Chem. Rev.* **102**:4751–4804.
- Grand, R. J., Grabham, P. W., Gallimore, M. J. and Gallimore, P. H. (1989). Modulation of morphological differentiation of human neuroepithelial cells by serine proteases: Independence from blood coagulation. *Embo. J.* **8**:2209–2215.
- Guroff, G. (1964). A Neutral, Calcium-activated Proteinase from the Soluble Fraction of Rat Brain. *J. Biol. Chem.* **239**:149–155.
- Gurwitz, D. and Cunningham, D. D. (1988). Thrombin modulates and reverses neuroblastoma neurite outgrowth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **85**:3440–3444.
- Guttridge, D. C., Lau, A., Tran, L. and Cunningham, D. D. (1997). Thrombin causes a marked delay in skeletal myogenesis that correlates with the delayed expression of myogenin and p21CIP1/WAF1. *J. Biol. Chem.* **272**:24117–24120.
- Herrera-Mendez, C. H., Becila, S., Blanchet, X., Pelissier, P., Delourme, D., Coulis, G., Sentandreu, M. A., Boudjellal, A., Bremaud, L. and Ouali, A. (2009). Inhibition of human initiator caspase 8 and effector caspase 3 by cross-class inhibitory bovSERPINA3-1 and A3-3. *FEBS Lett.* **583**:2743–2748.
- Herrera-Mendez, C. H., Becila, S., Boudjellal, A. and Ouali, A. (2006a). Meat ageing : Reconsideration of the current concept. *Trends Food Sci. Technol.* **17**:394–405.
- Herrera-Mendez, C. H., Becila, S., Coulis, G., Sentandreu, M. A., Aubry, L. and Ouali, A. (2010). Purification and partial characterization of antithrombin III from bovine skeletal muscle and possible role of thrombin in post-mortem apoptosis development and in efficiency of low voltage electrical stimulation. *Food Res. Int.* **43**:356–363.
- Herrera-Mendez, C. H., Bremaud, L., Coulis, G., Pelissier, P., Sentandreu, M. A., Aubry, L., Delourme, D., Chambon, C., Maftah, A., Leveziel, H. and Ouali, A. (2006b). Purification of the skeletal muscle protein Endopin 1B and characterization of the genes encoding Endopin 1A and 1B isoforms. *FEBS Lett.* **580**:3477–3484.
- Horvath, A. J., Forsyth, S. L. and Coughlin, P. B. (2004). Expression patterns of murine antichymotrypsin-like genes reflect evolutionary divergence at the serpin3 locus. *J. Mol. Evol.* **59**:488–497.
- Horvath, A. J., Lu, B. G., Pike, R. N. and Bottomley, S. P. (2011). Methods to measure the kinetics of protease inhibition by serpins. *Methods Enzymol.* **501**:223–235.
- Huntington, J. A., Read, R. J. and Carrell, R. W. (2000). Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature.* **407**:923–926.
- Jalink, K. and Moolenaar, W. H. (1992). Thrombin receptor activation causes rapid neural cell rounding and neurite retraction independent of classic second messengers. *J. Cell Biol.* **118**:411–419.
- Jeremiah, L. E. and Gibson, L. L. (2003). The effects of postmortem product handling and aging time on beef palatability. *Food Res. Int.* **36**:929–941.
- Kelvin, D. J., Simard, G., Sue, A. Q. A. and Connolly, J. A. (1989). Growth factors, signaling pathways, and the regulation of proliferation and differentiation in BC3H1 muscle cells. II. Two signaling pathways distinguished by pertussis toxin and a potential role for the ras oncogene. *J. Cell Biol.* **108**:169–176.
- Kemp, C. M. and Parr, T. (2012). Advances in apoptotic mediated proteolysis in meat tenderisation. *Meat. Sci.* **92**:252–259.
- Kemp, C. M., Sensky, P. L., Bardsley, R. G., Buttery, P. J. and Parr, T. (2010). Tenderness—an enzymatic view. *Meat. Sci.* **84**:248–256.
- Lamkanfi, M., Festjens, N., Declercq, W., Vanden Berghe, T. and Vandenaebelle, P. (2007). Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death. Differ.* **14**:44–55.
- Law, R. H., Zhang, Q., McGowan, S., Buckle, A. M., Silverman, G. A., Wong, W., Rosado, C. J., Langendorf, C. G., Pike, R. N., Bird, P. I. and Whisstock, J. C. (2006). An overview of the serpin superfamily. *Genome. Biol.* **7**:216.
- Liu, Y., Fields, R. D., Festoff, B. W. and Nelson, P. G. (1994). Proteolytic Action of Thrombin Is Required for Electrical Activity-Dependent Synapse Reduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **91**:10300–10304.
- Majumder, R., Weinreb, G. and Lentz, B. R. (2005). Efficient thrombin generation requires molecular phosphatidylserine, not a membrane surface. *Biochemistry.* **44**:16998–17006.
- Mann, K. G. (1999). Biochemistry and physiology of blood coagulation. *Thromb. Haemost.* **82**:165–174.
- Musilova, P., Lahbib-Mansais, Y., Yerle, M., Cepica, S., Stratil, A., Coppieters, W. and Rubes, J. (1995). Assignment of pig alpha 1-antichymotrypsin (AACT or PI2) gene to chromosome region 7q23-q26. *Mamm Genome.* **6**:445.
- Nelson, R. B. and Siman, R. (1990). Thrombin and its inhibitors regulate morphological and biochemical differentiation of astrocytes in vitro. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **54**:93–104.
- O'Riordan, M. X., Bauler, L. D., Scott, F. L. and Duckett, C. S. (2008). Inhibitor of apoptosis proteins in eukaryotic evolution and development: A model of thematic conservation. *Dev. Cell.* **15**:497–508.
- Olson, S. T. and Gettins, P. G. (2011). Regulation of proteases by protein inhibitors of the serpin superfamily. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **99**:185–240.

- Orlowski, M. and Wilk, S. (1981). A multicatalytic protease complex from pituitary that forms enkephalin and enkephalin containing peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **101**:814–822.
- Ouali, A. (1990). Meat Tenderization: Possible Causes and Mechanisms. A Review. *J. Muscle Foods.* **1**:129–165.
- Ouali, A., Bige, L., Obled, A., Lacourt, A. and Valin, C. (1986). Small and high molecular weight protease inhibitors from bovine skeletal muscle. In Cysteine Proteinases and their Inhibitors. *Walter de Gruyter and Co.*, Berlin (Turk, V., ed.), :545–554. [Ce: check journal title abbreviation]
- Ouali, A., Herrera-Mendez, C. H., Coulis, G., Becila, S., Boudjellal, A., Aubry, L. and Sentandreu, M. A. (2006). Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat. Sci.* **74**:44–58.
- Ouali, A., Herrera-Mendez, C. H., Coulis, G., Samira, B., Boudjellal, A., Harhoura, K., Aubry, L. and Sentandreu, M. A. (2007). Meat tenderisation and muscle cell death, two highly related events. *Tehnologija Mesa.* **48**:1–15.
- Ouali, A., Rouchon, P., Zabari, M., Berri, M., Zamora, F. and Tassy, C. (1995). Natural serine and cysteine proteinase inhibitors in bovine skeletal muscle. In *Expression of tissue proteinases and regulation of protein degradation as related to meat quality* Edited by: Ouali A, Demeyer D, Smulders FJM. Utrecht (NL): ECCEAMST 173–198. [Ce: check style?]
- Ouali, A. and Talmant, A. (1990). Calpains and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal muscles. *Meat. Sci.* **28**:331–348.
- Pejler, G., Abrink, M., Ringvall, M. and Wernersson, S. (2007). Mast cell proteases. *Adv. Immunol.* **95**:167–255.
- Pelissier, P., Delourme, D., Germot, A., Blanchet, X., Becila, S., Maftah, A., Leveziel, H., Ouali, A. and Bremaud, L. (2008). An original SERPINA3 gene cluster: Elucidation of genomic organization and gene expression in the Bos taurus 21q24 region. *BMC Genomics.* **9**:151.
- Philchenkov, A. (2004). Caspases: Potential targets for regulating cell death. *J. Cell Mol. Med.* **8**:432–444.
- Rosenberg, R. D. and Damus, P. S. (1973). The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor. *J. Biol. Chem.* **248**:6490–6505.
- Schechter, N. M. and Plotnick, M. I. (2004). Measurement of the kinetic parameters mediating protease-serpin inhibition. *Methods.* **32**:159–168.
- Sentandreu, M. A., Coulis, G. and Ouali, A. (2002). Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends Food Sci. Technol.* **13**:400–421.
- Shackelford, S. D., Koohmaria, M., Miller, M. F., Crouse, J. D. and Reagan, J. O. (1991). An evaluation of tenderness of the longissimus muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. *J. Anim. Sci.* **69**:171–177.
- Silverman, G. A., Bird, P. I., Carrell, R. W., Church, F. C., Coughlin, P. B., Gettins, P. G., Irving, J. A., Lomas, D. A., Luke, C. J., Moyer, R. W., Pemberton, P. A., Remold-O'Donnell, E., Salvesen, G. S., Travis, J. and Whisstock, J. C. (2001). The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J. Biol. Chem.* **276**:33293–33296.
- Silverman, G. A., Whisstock, J. C., Bottomley, S. P., Huntington, J. A., Kaiserman, D., Luke, C. J., Pak, S. C., Reichhart, J. M. and Bird, P. I. (2010). Serpins flex their muscle: I. Putting the clamps on proteolysis in diverse biological systems. *J. Biol. Chem.* **285**:24299–24305.
- Stauber, W. T., Fritz, V., Dahlmann, B. and Reinauer, H. (1983a). Immunohistochemical localization of two proteinases in skeletal muscle. *J. Histochem. Cytochem.* **31**:827–830.
- Stauber, W. T., Ong, S. H., Fritz, V. K., Esnard, F. and Gauthier, F. (1983b). Protease inhibitor localization in control and streptozotocin-diabetic skeletal muscles. *Histochem. J.* **15**:1079–1086.
- Stennicke, H. R., Ryan, C. A. and Salvesen, G. S. (2002). Reprise from execution: The molecular basis of caspase inhibition. *Trends Biochem. Sci.* **27**:94–101.
- Suidan, H. S., Niclou, S. P., Dreesen, J., Beltraminelli, N. and Monard, D. (1996). The thrombin receptor is present in myoblasts and its expression is repressed upon fusion. *J. Biol. Chem.* **271**:29162–29169.
- Suidan, H. S., Stone, S. R., Hemmings, B. A. and Monard, D. (1992). Thrombin Causes Neurite Retraction in Neuronal Cells through Activation of Cell-Surface Receptors. *Neuron.* **8**:363–375.
- Swanson, R., Raghavendra, M. P., Zhang, W. Q., Froelich, C., Gettins, P. G. W. and Olson, S. T. (2007). Serine and cysteine proteases are translocated to similar extents upon formation of covalent complexes with serpins - Fluorescence perturbation and fluorescence resonance energy transfer mapping of the protease binding site in CrmA complexes with granzyme B and caspase-1. *J. Biol. Chem.* **282**:2305–2313.
- Tassy, C. (1998). Purification et caractérisation d'un inhibiteur de sérine protéinases à partir de muscle squelettique de bovin. PhD Thesis, EPHE, Paris.
- Tassy, C., Herrera-Mendez, C. H., Sentandreu, M. A., Aubry, L., Bremaud, L., Pelissier, P., Delourme, D., Brillard, M., Gauthier, F., Leveziel, H. and Ouali, A. (2005). Muscle endopin 1, a muscle intracellular serpin which strongly inhibits elastase: Purification, characterization, cellular localization and tissue distribution. *Biochem. J.* **388**:273–280.
- Taylor, R. C., Cullen, S. P. and Martin, S. J. (2008). Apoptosis: Controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**:231–241.
- Whisstock, J. C., Silverman, G. A., Bird, P. I., Bottomley, S. P., Kaiserman, D., Luke, C. J., Pak, S. C., Reichhart, J. M. and Huntington, J. A. (2010). Serpins flex their muscle: II. Structural insights into target peptidase recognition, polymerization, and transport functions. *J. Biol. Chem.* **285**:24307–24312.
- Ye, S., Cech, A. L., Belmares, R., Bergstrom, R. C., Tong, Y., Corey, D. R., Kanost, M. R. and Goldsmith, E. J. (2001). The structure of a Michaelis serpin-protease complex. *Nat. Struct. Biol.* **8**:979–983.
- Zamora, F., Aubry, L., Sayd, T., Lepetit, J., Lebert, A., Sentandreu, M. A. and Ouali, A. (2005). Serine peptidase inhibitors, the best predictor of beef ageing amongst a large set of quantitative variables. *Meat. Sci.* **71**:730–742.
- Zamora, F., Debiton, E., Lepetit, J., Lebert, A., Dransfeld, E. and Ouali, A. (1996). Predicting variability of ageing and toughness in beef M. Longissimus lumborum et thoracis. *Meat. Sci.* **43**:321–333.
- Zoubine, M. N., Ma, J. Y., Smirnova, I. V., Citron, B. A. and Festoff, B. W. (1996). A molecular mechanism for synapse elimination: Novel inhibition of locally generated thrombin delays synapse loss in neonatal mouse muscle. *Dev. Biol.* **179**:447–457.

Résultats concernant le rôle des serpinines bovines dans la régulation de processus apoptotique

Les serpinines purifiées à partir du muscle bovin semblent constituer un moyen de contrôle efficace du processus apoptotique dans la mesure où :

1- Elles inhibent fortement les caspases initiateuses (caspase 8) et effectrices (caspase 3) du processus apoptotique avec des constantes de vitesse d'association (K_{ass}) se situant dans la gamme de 10^5 à $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ indiquant que cette inhibition a une signification physiologique élevée (Herrera-Mendez *et al.*, 2009) ;

2- Elles sont capables de former des complexes stables avec les caspases. Ces complexes étant covalents, l'inhibition des caspases est, par voie de conséquence, pratiquement irréversible.

II.1- Constantes de vitesse d'association (K_{ass}) entre serpinines et enzymes cibles

La constante de vitesse d'association (k_{ass}) pour la formation d'un complexe stable entre l'enzyme et la serpinine est une valeur importante dans le contexte d'un mécanisme de substrat suicide ou inhibiteur suicide (Stone *et al.*, 1997). Cette constante doit avoir une valeur minimale de $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ($k_{ass} \geq 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) pour être considérée comme pouvant avoir une fonction physiologique.

Dans cette étude, les constantes de vitesse d'association (k_{ass}) entre enzymes et inhibiteurs purifiés (Bov-SerpinA3-1 et Bov-SerpinA3-3) ont été déterminées selon Schechter et Plotnick, (2004) et Horvath *et al.*, (2011). Les résultats sont présentés dans le **TABLEAU 2** (page 961 de l'article).

Les Bov-SerpinA3-1 et Bov-SerpinA3-3 ont été testées contre les caspases, un groupe de cystéine peptidases responsables de la mort cellulaire pendant l'apoptose. Les résultats montrent une très forte capacité à inhiber deux caspases testées qui sont : la caspase 8, caspase impliquée dans l'initiation de processus apoptotique, et la caspase 3, caspase impliquée dans l'exécution de ce processus qui conduit à la déstructuration de la fibre musculaire. Les constantes d'association caractérisant l'interaction avec ces deux caspases ne diffèrent guère d'une serpinine à l'autre. Concernant l'interaction Bov-SerpinA3-1 /caspases, les valeurs obtenues sont $k_{ass}=4,23 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour la caspase 3 et $k_{ass}=1,40 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour la

caspase 8. Pour la Bov-SerpinA3-3, elles sont de $k_{ass}=1,55 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour la caspase 3 et $k_{ass}=2,72 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour la caspase 8. Dans les deux cas l'action de ces serpines semble légèrement plus efficace contre la caspase 8 que contre la caspase 3.

Il est à noter que jusqu'à ce jour, les seuls inhibiteurs vrais connus des caspases sont des inhibiteurs d'origine virale (Cowpox virus, Baculovirus). Dans les cellules infectées, le Cowpox virus (crmA) bloque le processus apoptotique lors de la multiplication du virus (Stennicke *et al.*, 2002, Dobo *et al.*, 2006). Les autres inhibiteurs communément considérés sont les IAP (Inhibiteurs de l'APoptose) qui ont des affinités beaucoup plus faibles que les serpines. Leur mode d'action est différent puisqu'ils vont créer un encombrement du site actif sans s'associer de façon intime avec ce dernier comme c'est le cas de la majorité des inhibiteurs de protéases. Leurs sites de fixation sont en effet à l'extérieur du site actif.

Les Bov-SerpinA3-1 et Bov-SerpinA3-3 purifiées dans le cadre de cette étude à partir de muscle de bovin seraient les premiers inhibiteurs cellulaires de caspases décrits à ce jour. Il est intéressant de noter que ces serpines sont actives aussi bien contre les caspases initiatrices et les caspases exécuteurs, ajoutant ainsi deux niveaux complémentaires de contrôle du processus apoptotique.

II.2- Capacité à former des complexes enzyme inhibiteur stables en SDS

Une propriété intéressante des serpines inhibitrices est leur capacité de former un complexe stable avec l'enzyme cible qui est résistant à la chaleur et au traitement par le SDS (Travis et Salvensen, 1983 ; Potempa *et al.*, 1984 ; Twining, 1994).

L'inhibition des cystéines protéases par les serpines se déroule selon le même mécanisme de piégeage que pour les sérines protéases (Swanson *et al.*, 2007). Sur SDS-PAGE, nous pouvons donc nous attendre à identifier les complexes covalents pour toutes les protéases qui sont fortement inhibées par les isoformes Bov-SerpinA3. Comme l'illustre la **FIGURE 3** (page 962 de l'article) pour Bov-SerpinA3-1, les serpinines bovines (70 kDa) peuvent donc former des complexes SDS-Stable (C) avec : la trypsine pancréatique bovine, l'élastase des leucocytes humaines, la caspase 3 humaine (caspase effectrice) et la caspase 8 humaine (Caspase initiatrice) (Tassy *et al.*, 2005; Herrera-Mendez *et al.*, 2006b; Herrera-Mendez *et al.*, 2009).

En ce qui concerne les caspases 3 et 8, la préincubation de ces enzymes avec Bov-SerpinA3-1 conduit à un complexe stable à SDS d'environ 100-110 kDa. Selon la valeur des poids moléculaires, les complexes comprennent l'inhibiteur clivé (70 kDa) et la caspase (30 kDa) transportée vers le pôle distal de la serpine (Herrera-Mendez *et al.*, 2009). La caspase liée par une liaison covalence est très probablement une fraction hétérodimère (avec ou sans la petite sous-unité) de la molécule tétramère, l'autre fragment étant très probablement dissocié lors de la dénaturation thermique de l'échantillon en présence de SDS. D'autres recherches sont nécessaires pour clarifier les mécanismes exacts de la formation du complexe caspase / Bov-SerpinA3 et le comportement des sous-unités caspases lors de la formation complexe. Il est à noter que dans la **FIGURE 3** (page 962 de l'article), la bande de 140 kDa observée pour toutes les peptidases correspond à un dimère de la serpin comme évalué par l'analyse de la séquence N-terminale (Tassy *et al.*, 2005).

II.3- Fonctions biologiques possibles de Bov-serpinA 3

En raison de leur capacité à inhiber les caspases initiatrices et effectrices, deux fonctions principales ont été identifiées. La première concerne la régulation de l'apoptose par inhibition pseudo-irréversible directe des caspases. La seconde est une conséquence de la première fonction, car les serpines contribuent probablement à la survie des cellules musculaires dans les deux premières phases de différenciation, (phases de prolifération et de confluence). Il a été constaté que pendant la différenciation des cellules musculaires, une résistance à la mort cellulaire a souvent été signalée dans les premiers stades de différenciation correspondant à la prolifération et à la confluence de myoblastes. La survie cellulaire est une condition préalable à la différenciation du myoblaste primaire (Lamkanfi *et al.*, 2007), et les présentes serpines inhibant les caspases pourraient être un candidat potentiel pour une telle fonction grâce à une inhibition totale des caspases.

En effet, tous les résultats obtenus dans le présent travail démontrent clairement que les cellules eucaryotes ont développé des inhibiteurs de caspases très efficaces appartenant à la famille des serpines, une famille d'inhibiteurs bien connus pour former des complexes pseudo-irréversibles avec leurs peptidases cibles. Une telle inhibition plus radicale des caspases qu'avec les IAPs est en effet essentielle et constitue probablement une condition préalable absolue à une régulation fine et efficace de l'apoptose. En soutenant les résultats *in vitro*, les complexes caspase-serpin peuvent être détectés dans le muscle *post-mortem* prélevé juste après la mort par western blot en utilisant des anticorps anti-caspase et anti-serpines (**FIGURE 8B**,

page 965 de l'article) soulignant que l'activation des caspases est effectuée dans le muscle *post-mortem* contrairement à ce qui a été suggéré par certains scientifiques de la viande. Cela explique probablement pourquoi les inhibiteurs de la trypsine quantifiés par titrage dans des extraits de muscle brut ont été un meilleur prédicteur de la tendreté ultime de la viande que les niveaux de calpains 1 et 2, la concentration de calpastatine et le taux d'inhibiteurs des cystéines protéases évalués par l'inhibition d'une préparation de papaine pré-titrée (Zamora et al., 1996; Zamora et al., 2005). Ces inhibiteurs de serine protéase sont principalement composés de serpins inhibitrices de classe croisée capables d'inhiber fortement et pseudo-irréversiblement les caspases initiateuses et effectrices comme Bov-Serpina3-1 à A3-6 et seraient donc de bons candidats pour des prédicteurs précis de la tendreté de la viande. Les niveaux les plus élevés de serpins inhibant les caspases sont ainsi observés dans la viande la plus dure (Zamora et al., 1996; Zamora et al., 2005).

II.4- Implication des bovSERPINA3s dans le processus apoptotique

Selon la nature du stimulus qui déclenche la mort cellulaire par apoptose, nous distinguons deux voies d'activation de ce processus : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque (Figure 8 A, page 365 de l'article).

A- Voie extrinsèque

Dans ce cas le stimulus déclencheur de l'apoptose est d'origine extracellulaire. Il s'agit d'un ligand qui va venir se fixer sur le récepteur de mort (Death Receptor). La fixation de ce ligand au récepteur va déclencher l'activation de complexes transmembranaires capables d'activer les procaspases initiateuses (caspases 8 et 10) en caspases actives qui vont, à leur tour, activer, par protéolyse ménagée, les procaspases effectrices (caspase 3, 6 et 7) en caspases actives. Ces dernières vont ensuite initier la dégradation des structures cellulaires et la mort de la cellule. Dans tous les cas, cette voie est associée à une altération profonde des mitochondries qui vont déverser, dans le compartiment cytoplasmique, des activateurs du processus apoptotique intervenant à différents niveaux du processus [cytochrome c, inhibiteur capable de dissocier les complexes caspases-IAP (Inhibiteur d'apoptose), ... etc].

B- Voie intrinsèque

Cette voie est déclenchée par la cellule elle-même lorsque celle-ci se trouve dans des conditions difficiles de survie et où la mort cellulaire est le seul échappatoire. L'initiation du processus est le résultat d'une altération profonde des mitochondries qui vont libérer des activateurs d'apoptose similaires à ceux qui interviennent dans la voie extrinsèque. C'est le cas en particulier du cytochrome c qui est indispensable à la formation de l'apoptosome (complexe impliquant le Cyt C, l'Apaf-1 (*Apoptose Activating Factor-1*), de la procaspase 9 et d'autres constituants à activité pro-apoptotique. Une fois activée, la caspase 9 va à son tour activer les procaspases exécutrices en caspases actives.

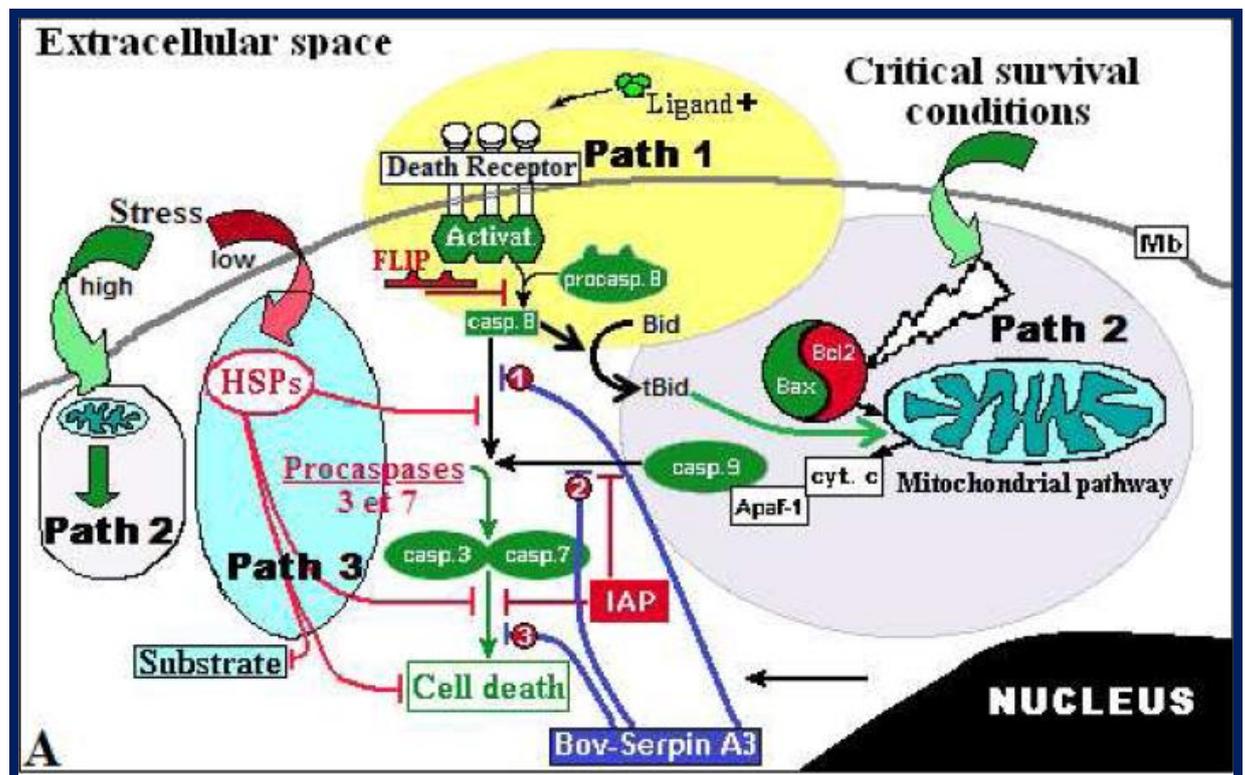


FIGURE 8 A (de l'article page 895): Schéma de la régulation de l'apoptose impliquant les bovSERPINA3s (adapté de Philchenkov, 2004). La nouvelle voie de contrôle représenté dans le schéma est l'inhibition pseudo-irréversible des caspases par les Bov-serpinA3s. Ceci affecte différentes étapes du processus apoptotique. Le premier point de contrôle (1) est l'inhibition des caspases initiatrices, c'est-à-dire la caspase 8 et probablement aussi la caspase 10. Le deuxième (2) est l'inhibition probable de la caspase 9, une autre caspase initiatrice. Le troisième et dernier point est l'inhibition de la caspase 3 et, selon les résultats récents, la

caspase 7. Dans le diagramme actuel, nous introduisons un troisième chemin pour souligner le rôle majeur des protéines de choc thermique (HSP). Ces protéines sont généralement exprimées dès qu'une cellule subit un stress pour préserver toutes les fonctions cellulaires en protégeant leurs protéines cibles de toute perte de structure et / ou d'activité. Les HSP peuvent donc avoir des actions anti-apoptotiques diverses en protégeant les substrats protéiques cibles de l'hydrolyse par les caspases et d'autres systèmes protéolytiques et en formant des complexes avec des caspases diverses à différentes étapes du processus, entravant ainsi leur fonction (Arrigo, 2005; Beere, 2005). **Abréviations** : *Apaf-1*, *APoptose Activating Factor-1* ; *IAP*, *Inhibitor of APoptose* ; *Bax* et *Bcl2* : deux protéines de la même famille avec effets opposés ; *Activat.* : complexe d'activation des caspases initiatrices ; *Cyt c* : cytochrome c ; *HSP*: *heat shock proteins* ou *protéines du stress thermique*.

Conclusions
et
Perspectives

Pour notre thèse, nous nous sommes fixés deux objectifs :

- A- Mise en évidence de l'ubiquité du phénomène de l'apoptose chez différentes espèces bouchères et chez le poisson d'eau douce après avoir choisi trois marqueurs de l'apoptose ;
- B- Réaliser un état de l'art sur les serpinines comme marqueur de la tendreté de la viande bovine.

Il nous semble donc tout à fait naturel de distinguer ces deux parties dans notre conclusion générale.

A- Ubiquité du phénomène de l'apoptose

A ce propos, nous avons mis en évidence la dégradation de l'actine (poids moléculaire de 42 kDa) dans le muscle *Longissimus dorsi* chez 6 espèces : bovine, ovine, caprine, cameline, poulet de chair et carpe commune (poisson d'eau douce) au stade de la maturation par Western Blot. Les résultats ont révélé l'existence de fragments d'actine de différents poids moléculaires : 32, 28, 19, 15, 18, 12 et 10 kDa. Le fragment de 32 kDa a été retrouvé chez le poisson d'eau douce, le bovin et l'ovin. Le fragment de 28 kDa a été révélé chez toutes les espèces alors que le fragment de 19 kDa n'a été obtenu que chez le caprin et les fragments 18 et 10 kDa n'ont concerné que le camelin. Les autres fragments de faible poids moléculaire : 15 et 12 kDa n'ont été rencontrés que chez les bovins, ovins, Caprins et poulet. La différence de la dégradation de l'actine peut s'expliquer par une variation du rapport enzyme/inhibiteur entre espèces, reflétant l'efficacité des systèmes protéolytiques.

Nous avons poursuivi le travail chez une espèce de poisson d'eau douce (*Cyprinus carpio* ou carpe commune) pour la mise en évidence de l'externalisation des phosphatidylserines (PS) membranaires, la dégradation de l'actine et la libération du cytochrome c (cyt c) au cours du temps *post-mortem*.

A.1- L'externalisation des PS membranaires par marquage à l'annexine V conjuguée à la FITC a donné une couleur verdâtre. Le marquage de la laminine (protéine basale) conjuguée à la cyanine 3 a donné une couleur rouge. La fusion des images correspondant à la laminine et au marquage PS a donné une couleur jaune, résultat indiquant une co-localisation de la laminine et de l'annexine V. Cette modification de couleur a été observée à la fois à 0 h et 6 h *post-mortem*. Nous savons que la co-localisation est liée aux PS extracellulaires et non aux phospholipides acides intracellulaires. Nous avons noté que la

couleur jaune était plus intense dans l'échantillon de 6 h d'où nous avons conclu à une augmentation du nombre de PS externalisées entre 0 et 6 h *post-mortem*.

A-2- La dégradation de l'actine et la libération du cytochrome c (cyt c) ont été étudiées par Western Blot à différents temps *post-mortem* dans la fraction soluble (surnageant) et ont été quantifiées par la suite par densitométrie. Une série de fragments d'actine de poids moléculaire compris entre 41 et 30 kDa a été révélée. L'évolution de la concentration du fragment de 32 kDa a montré une augmentation de sa concentration juste après la mort de l'animal et avait atteint son niveau maximum à 4-5 h *post-mortem*. Ceci a coïncidé avec le plateau de pH observé entre 4 et 5 h *post-mortem*. La concentration de ce fragment a diminué par la suite pour atteindre un niveau minimum à environ 24 h après la mort de l'animal. Ceci nous a permis de suggérer que ce fragment a été encore dégradé pour en donner de plus petits non détectables par Western Blot dans la fraction soluble. Concernant le cyt c, les résultats ont montré que son apparition dans le cytosol commence immédiatement après la mort et atteint sa concentration maximale à environ 10 h *post-mortem* et à un pH de 6,9. Ceci pourrait expliquer que la mort cellulaire par apoptose dans le muscle *post-mortem* emprunte probablement la voie intrinsèque mitochondriale.

Ouali *et al.* (2006) avaient émis l'hypothèse que juste après l'abattage de l'animal, le muscle s'engage dans un programme de mort cellulaire par apoptose. Cette hypothèse a été confirmée pour le rat par Becila *et al.* (2010) en apportant des preuves de rétrécissement cellulaire, d'inversion des PS et de dégradation de l'actine classée parmi les protéines cibles de la caspase 3 et ce quelques minutes après la mort du rat. Nous pouvons donc conclure que nos résultats corroborent ceux de Becila *et al.* (2010).

Ces résultats confirment la mise en place, dès les premiers instants qui suivent la mort, du processus apoptotique dans les cellules musculaires dont les premières altérations sont probablement liées à l'action des caspases.

B- Serpines bovines comme biomarqueurs de tendreté

Les serpines purifiées à partir du muscle de bovin par Herrera-Mendez *et al.* (2006) et Tassy *et al.* (2005) étaient la serpine A 3-1, la serpine A 3-3 et serpine C 1 (ou l'antithrombine III). Toutes ont une fonction essentielle dans le processus apoptotique.

La serpine C 1 inhibe fortement la thrombine de manière dépendante de l'héparine. Dans notre synthèse (Boudida *et al.*, 2016), il nous a été permis de préciser que la

thrombine contribue à l'isolement des cellules mourantes du système nerveux et que les serpinines A 3-1 et A 3-3 inhibaient la caspase 8 (caspase initiatrice) et la caspase 3 (caspase effectrice). Les constantes de vitesse d'association entre la serpine A 3-1 et les caspases 3 et 8 étaient respectivement $k_{\text{ass}} = 4,23 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ et $k_{\text{ass}} = 1,40 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ alors que les constantes de vitesse d'association entre la serpine A 3-3 et les caspases 3 et 8 étaient respectivement $k_{\text{ass}} = 1,55 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ et $k_{\text{ass}} = 2,72 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Ces résultats nous permettent de montrer que ces serpinines étaient actives aussi bien contre les caspases initiatrices que contre les caspases exécuteurs, ajoutant ainsi deux niveaux complémentaires de contrôle du processus apoptotique. Ces résultats confirment la forte inhibition des caspases par les serpinines bovines, ce qui en fait des acteurs de tout premier plan pour bloquer le processus apoptotique.

Au terme de notre étude, il nous semble donc pouvoir dégager trois perspectives :

1. En rapport avec l'ubiquité du phénomène d'apoptose, il est souhaitable de poursuivre en utilisant d'autres techniques protéomiques plus efficaces afin de mieux caractériser les différentes bandes obtenues à partir de la dégradation de l'actine. Nous recommandons de séparer les protéines myofibrillaires par électrophorèse bidimensionnelle, de caractériser l'identité des fragments d'actine par spectrométrie de masse et de réaliser une cinétique de dégradation de l'actine pour chaque espèce afin de déterminer le temps *post-mortem* de la dégradation de l'actine.
2. En rapport avec notre étude chez *Cyprinus carpio* (ou carpe commune), la protéolyse et le stockage inadéquat des poissons entiers semblent entraîner des changements indésirables dans la texture de leur chair. D'autres travaux sont alors nécessaires pour élucider les mécanismes d'action des systèmes protéolytiques notamment les caspases apoptogènes afin de mieux maîtriser la fraîcheur et la fermeté du poisson. A notre avis, de nouveaux travaux portant sur l'expression des HSPs et la caspase 3 dans la chair *post mortem* devraient être envisagés.
3. En rapport avec les serpinines bovines, d'autres recherches sont nécessaires pour vérifier l'activité post mortem des caspases, clarifier les mécanismes exacts de la formation du complexe caspase/Bov-SerpinA3 et préciser le comportement des sous-unités caspases lors de la formation de ce complexe.

*Références
bibliographiques*

A

- Adhihetty P. J., & Hood, D. A. (2003). Mechanisms of apoptosis in skeletal muscle. *Basic Appl Myol* 13 (4): 171-179, 2003
- Akaaboune M., Hantai D., Smirnova I., Lachkar S., Kapsimali M., Verdiere-Sahuque M. & Festoff B.W. (1998) Developmental regulation of the serpin, protease nexin I, localization during activity-dependent polyneuronal synapse elimination in mouse skeletal muscle. *J Comp Neurol* 397, 572-9.
- Alnemri E.S., Livingston D.J., Nicholson D.W., Salvesen G., Thornberry N.A., Wong W.W. & Yuan J. (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 171.
- Anderson, L. & Anderson, N.G. (1977). High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins (genetic variants/polymorphism/genetic screening). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, (12) : 5421 – 5425.
- Annand, R. R., Dahlen, J. R., Sprecher, C. A., de Dreu, P., Foster, D. C., Mankovich, J. A., Talanian, R. V., Kisiel, W. & Giegel, D. (1999). Caspase-1 (interleukin-1beta-converting enzyme) is inhibited by the human serpin analogue proteinase inhibitor 9. *Biochem. J.*, 342, 655-665.
- Aranishi, F. (1999). Purification and characterization of serum serpin from carp (*Cyprinus carpio*). *Mar. Biotechnol.* 1, 81 – 88.
- Arrigo A.P. (2005) Heat shock proteins as molecular chaperones. *M S-Medecine Sciences* 21, 619-25.
- Arrigo A.P., Paul C., Ducasse C., Manero F., Kretz-Remy C., Virost S., Javouhey E., Mounier N. & Diaz-Latoud C. (2002) Small Stress Proteins: Novel Negative Modulators of Apoptosis Induced Independently of Reactive Oxygen Species. In: *Small Stress Proteins* (eds. by Arrigo A-P & Müller WEG), pp. 185-204. Springer Berlin Heidelberg.
- Ashkenazi A. (2002) Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2, 420-30.
- Asumendi A., Andollo N., Boyano M.D., Hilario E., Perez-Yarza G., Atencia R., Arechaga J., Garcia-Sanz M. (2000). The role of cleavage of cell structures during apoptosis. *Cell Mol. Biol*, 46, 1–11.
- Atencia R., Asumendi A. & García-Sanz M. (2000) Role of cytoskeleton in apoptosis. In: *Vitamins & Hormones* pp. 267-97. Academic Press.
- Aussel C., Pelassy C. & Breitmayer J.P. (1998) CD95 (Fas/APO-1) induces an increased phosphatidylserine synthesis that precedes its externalization during programmed cell death. *FEBS Lett* 431, 195-9.

B

- Barrett, A. J. (1980a). Fluorimetric assay for cathepsin B and cathepsin H. *Biochem. J.*, 187, 909-912.

- Beatty, K., Bieth, J. & Travis, J. (1980) Kinetics of association of serine proteinases with native and oxidized α -proteinase inhibitor and α -1-antichymotrypsin. *J. Biol. Chem.*, 255, 3931-3934.
- Becila S., Herrera-Mendez C.H., Coulis G., Labas R., Astruc T., Picard B., Boudjellal A., Pelissier P., Bremaud L. & Ouali A. (2010) Postmortem muscle cells die through apoptosis. *European Food Research and Technology* 231, 485-93.
- Beere H.M. (2004) The stress of dying: the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J Cell Sci* 117, 2641-51.
- Beere H.M. (2005) Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *Journal of Clinical Investigation* 115, 2633-9.
- Beere, H.M. (2001). Stressed to death: Regulation of apoptotic signaling pathways by the heat shock proteins. *Science's STKE*, 93, RE1.
- Bendall J. (1973) Postmortem changes in muscle. *The structure and function of muscle* 2, 244-309.
- Benning, L.N., Whisstock, J.C., Sun, J., Bird, P.I., & Bottomley, S.P. (2004). The human serpin proteinase inhibitor-9 self-associates at physiological temperatures. *Protein Sci* 13, 1859-1864.
- Berman G, Afford SC, Burnett D, & Stockley RA (1986). α 1-Antichymotrypsin in lung secretions is not an effective proteinase inhibitor. *J Biol Chem* 261 : 14095 – 14099.
- Bernard C., Cassar-Malek I, Le Cunff M., Dubroeuq H., Renand G. & Hocquette J.F. (2007) New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. *J Agric Food Chem* 55, 5229-37.
- Berri C., Picard B., Leuret, B., Urra, J. D. A., Vautier, A., Chartrin, P., ... & Hocquette, J. F. (2016, November). Prédire la qualité des viandes: mythe ou réalité?. In *16. Journées Sciences du Muscle et Technologies des Viandes (JSMTV). Viandes & Produits Carnés* – Novembre 2016.
- Bervers E.M., Comfurius P. & Zwaal R.F. (1996) Regulatory mechanisms in maintenance and modulation of transmembrane lipid asymmetry: pathophysiological implications. *Lupus* 5, 480-7.
- Bieth, J. G. (1980). Pathophysiological interpretation of kinetic constants of protease inhibitors. *Bull. Europ. Physiopath. Resp.*, 16(suppl), 183-195.
- Bige, L., Ouali, A. & Valin, C. (1985). Purification and characterization of a low molecular weight cysteine proteinase inhibitor from bovine muscle. *Biochim. Biophys. Acta*, 843, 269-275.
- Bjarnadottir S.G., Hollung K., Faergestad E.M. & Veiseth-Kent E. (2010) Proteome changes in bovine longissimus thoracis muscle during the first 48 h postmortem: shifts in energy status and myofibrillar stability. *J Agric Food Chem* 58, 7408-14.
- Blanchet X., Pere-Brissaud A., Duprat N., Pinault E., Delourme D., Ouali A., Combet C., Maftah A., Pelissier P. & Bremaud L. (2012) Mutagenesis of the bovSERPINA3-3 demonstrates the requirement of aspartate-371 for intermolecular interaction and formation of dimers. *Protein Sci* 21, 977-86.

- Boudier C. & Bieth J.G. (2001) The Reaction of Serpins with Proteinases Involves Important Enthalpy Changes. *Biochemistry* 40, 9962-7.
- Boudjellal A., Becila S., Coulis G., Herrera-Mendez C.H., Aubry L., Lepetit J., Harhoura K., Sentandreu M.A., Ait-Amar H. & Ouali A. (2008) Is the pH drop profile curvilinear and either monophasic or polyphasic? Consequences on the ultimate bovine meat texture. *African Journal of Agricultural Research* 3, 195-204.
- Bouley J., Chambon C. & Picard B. (2004) Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 4, 1811-24.
- Bouton P.E., Carrol F.D., Harris P.V. & Shorthose W.R. (1973) Influence of pH and fiber contraction state upon factors affecting the tenderness of bovine muscle. *Journal of food science* 38, 404-7.
- Bouton P.E., Harris P.V., Macfarlane J.J. & Shorthose W.R. (1982) Influence of pH on the Warner-Bratzler shear properties of mutton. *Meat Science* 6, 27-36.
- Bozhkov P.V., Suarez M.F., Filonova L.H., Daniel G., Zamyatnin A.A. Jr, Rodriguez-Nieto S., Zhivotovsky B. & Smertenko A. (2005). Cysteine protease mcII-Pa executes programmed cell death during plant embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (40) : 14463 – 14468.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.
- Bratton D.L., Fadok V.A., Richter D.A., Kailey J.M., Guthrie L.A. & Henson P.M. (1997) Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* 272, 26159-65.
- Brocker C., Cantore M., Failli P. & Vasiliou V. (2011) Aldehyde dehydrogenase 7A1 (ALDH7A1) attenuates reactive aldehyde and oxidative stress induced cytotoxicity. *Chem Biol Interact* 191, 269-77.
- Brocker C., Lassen N., Estey T., Pappa A., Cantore M., Orlova V.V., Chavakis T., Kavanagh K.L., Oppermann U. & Vasiliou V. (2010) Aldehyde dehydrogenase 7A1 (ALDH7A1) is a novel enzyme involved in cellular defense against hyperosmotic stress. *J Biol Chem* 285, 18452-63.
- Bruce, D., Perry, D. J., Borg, J. Y., Carrell, R. W. & Wardell, M. R. (1994). Thromboembolic disease due to thermolabile conformational changes of antithrombin Rouen-VI (187 Asn-Asp). *J. Clin. Invest.*, 94, 2265-2274
- Bruch M., Weiss V., & Engel J. (1988). Plasma serine proteinase inhibitors (serpins) exhibit major conformational changes and a large increase in conformational stability upon cleavage at their reactive sites. *J Biol Chem* 263 : 16626 – 16630.
- Bursch W., Hochegger K., Torok L., Marian B., Ellinger A. et Hermann R.S. (2000). Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal laments. *J. Cell Sci*, 113, 1189 – 1198.

C

- Calvin, J., & Price, C.P. (1986). Measurement of serum alpha 1-antichymotrypsin by immunoturbidimetry. *Ann Clin Biochem.* 23 : 206 – 209.
- Cao J.-X., Ou C.-R., Zou Y.-F., Ye K.-P., Zhang Q.-Q., Khan M.A., Pan D.-D. & Zhou G. (2013) Activation of caspase-3 and its correlation with shear force in bovine skeletal muscles during postmortem conditioning. *Journal of Animal Science* 91, 4547-52.
- Carlson K. B., Prusa K. J., Fedler C. A., Steadham E. M., Huff-Lonergan E., & Lonergan S. M. (2017). Proteomic features linked to tenderness of aged pork loins. *Journal of Animal Science*. doi:10.2527/jas2016.1122
- Carrell, R. W., Stem, P. E., Fermi, G. & Wardell, M. R. (1994). Biological implication of a 3 Å structure of dimeric antithrombin. *Structure*, 2, 257-270.
- Cassar-Malek, I., Guillemin, N., Hocquette, J. F., Micol, D., Bauchart, D., Picard, B., & Jurie, C. (2011). Expression of DNAJA1 in bovine muscles according to developmental age and management factors. *Animal*, 5(6), 867–874.
- Chaillan-Huntington, C. E., Gettins, P.G.W., Huntington, J. A. & Patston, P. A. (1997). The P6-P2 region of serpins is critical for proteinase inhibition and complex stability. *FASEBJ* 11 : 2149.
- Chase, T. & Shaw, E. (1970). Titration of trypsin, plasmin and thrombin with p-nitrophenyl-p₁-guanidinobenzoate HCl. *Methods Enzymol.*, 19, 20-27.
- Chaze T., Hocquette J.-F., Meunier B., Renand G., Jurie C., Chambon C., Journaux L., Rousset S., Denoyelle C., Lepetit J. & Picard B. (2013) Biological Markers for Meat Tenderness of the Three Main French Beef Breeds Using 2-DE and MS Approach. In: *Proteomics in Foods* (eds. by Toldrá F & Nollet LML), pp.127-46. Springer US.
- Chen F., Chang R., Trivedi M., Capetanaki Y. & Cryns V.L. (2003) Caspase proteolysis of desmin produces a dominant-negative inhibitor of intermediate filaments and promotes apoptosis. *J Biol Chem* 278, 6848-53.
- Chhabra E.S., Ramabhadran V., Gerber S.A. & Higgs H.N. (2009) INF2 is an endoplasmic reticulum-associated formin protein. *J Cell Sci* 122, 1430-40.
- Choi Y.M., Lee S.H., Choe J.H., Rhee M.S., Lee S.K., Joo S.T. & Kim B.C. (2010) Protein solubility is related to myosin isoforms, muscle fiber types, meat quality traits, and postmortem protein changes in porcine longissimus dorsi muscle. *Livestock Science* 127, 183-91.
- Christensen, S. & Sottrup-Jensen, L. (1994). Characterization of two serpins from bovine plasma and milk. *Biochem. J.* 303, 383 – 390.
- Clarke P.G.H., Posada A., Primi M.P. & Castagné V. (1998) Neuronal death in the central nervous system during development. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 52, 356-62.
- Colell A., Ricci J.-E., Tait S., Milasta S., Maurer U., Bouchier-Hayes L., Fitzgerald P., Guio-Carrion A., Waterhouse N.J., Li C.W., Mari B., Barbry P., Newmeyer D.D., Beere H.M. & Green D.R. (2007) GAPDH and Autophagy Preserve Survival after Apoptotic Cytochrome c Release in the Absence of Caspase Activation. *Cell* 129, 983-97.
- Colell, A., Green, D. R., & Ricci, J. E. (2009). Novel roles for GAPDH in cell death and carcinogenesis. *Cell Death and Differentiation*, 16(12), 1573–1581.

D

- Dafforn T.R., Pike R.N. & Bottomley S.P. (2004). Physical characterization of serpin conformations. *Methods*, 32 (2) : 150 – 158.
- D'Alessandro A. & Zolla L. (2013) Foodomics to investigate meat tenderness. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 52, 47-53.
- Daniel N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2), 205-219.
- Davis, R. L., Shrimpton, A. E., Holohan, P. D., Bradshaw, C., Feiglin, D., Collins, G. H., & al. (1999). Familial dementia caused by polymerisation of mutant neuroserpin. *Nature*, 401, 376-379.
- Dementiev, A., Dobo, J., & Gettins, P.G. (2006). Active site distortion is sufficient for proteinase inhibition by serpins : Structure of the covalent complex of alpha-1-proteinase inhibitor with porcine pancreatic elastase. *J Biol Chem* 281, 3452 – 3457.
- Derechin, V. M., Blinder, M. A. & Tollefsen, D. M. (1990). Substitution of arginine for Leu444 in the reactive site of heparin cofactor II enhances the rate of thrombin inhibition. *J Biol Chem* 265 (10) : 5623 – 8.
- Deveraux Q.L. & Reed T.C. (1999) IAP family proteins - suppressors of apoptosis. *Genes & Development* 13,239-52.
- Devlin, G. L., Chow, M. K. M., Howlett, G. J. & Bottomley, S. P. (2002). Acid denaturation of alpha1-antitrypsin: characterisation of a novel mechanism of serpin polymerization. *J. Mol. Biol.*, 324, 859-870.
- Ding W.X., Shen H.M. & Ong C.N. (2002) Calpain activation after mitochondrial permeability transition in microcystin-induced cell death in rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 291, 321-31.
- Dingova H., Fukalova J., Maninova M., Philimonenko V.V. & Hozak P. (2009) Ultrastructural localization of actin and actin-binding proteins in the nucleus. *Histochem Cell Biol* 131, 425-34.
- Dirks, A. J., & Leeuwenburgh, C. (2005). The role of apoptosis in age-related skeletal muscle atrophy. *Sports Medicine*, 35, 473–483.
- Djie, M. Z., Le Bonniec, B. F., Hopkins, P. C, Hipler, K. & Stone, S. R. (1996). Role of the P2 residue in determining the specificity of serpins. *Biochemistry* 35 (35) : 11461-9.
- Djie, ML Z., Stone, S. R. & LeBonniec, B. F. (1997). Intrinsic specificity of the reactive site loop of alpha(1)- antitrypsin, alpha(1)-antichymotrypsin, antithrombin III, and protease nexin I. *J Biol Chem* 272 : 16268 – 16273.
- Dobó J., Swanson R., Salvesen G.S., Olson S.T. & Gettins P.G. (2006). Cytokine response modifier a inhibition of initiator caspases results in covalent complex formation and dissociation of the caspase tetramer. *J Biol Chem*, 281 (50) : 38781 – 38790.
- Dutaud, D., Aubry, L., Henry, L., Levieux, D., Hendil, K.B., Huehn, L., Bureau, J.P., & Ouali, A. (2002). Development and evaluation of a sandwich ELISA for quantification of the 20S proteasome in human plasma. *Journal of Immunological Methods*, 260 : 183–193.

E

- Eldering, E., Verpy, E., Roem, D., Meo, T. & Tosi, M. (1995). COOH-terminal substitutions in the serpin C1 inhibitor that cause loop overinsertion and subsequent multimerization. *J. Biol. Chem.*, 270, 2579 – 2587.
- Englard S. & Seiffter S. (1990). Precipitation techniques. *Meth. Enzymol.* 182, 287–300.

F

- Faber, J. P., Poller, W., Olek, K., Baumann, U., Carlson, J., Lindmark, B. & Eriksson, S. (1993). The molecular basis of alpha 1-antichymotrypsin deficiency in a heterozygote with liver and lung disease. *J. Hepatol.*, 18, 313 - 321.
- Fesik S.W. & Shi Y. (2001) Structural biology. Controlling the caspases. *Science* 294, 1477-8.
- Festoff B.W., Rao J.S. & Hantai D. (1991) Plasminogen activators and inhibitors in the neuromuscular system: III. The serpin protease nexin I is synthesized by muscle and localized at neuromuscular synapses. *J Cell Physiol* 147, 76-86.
- Fibbi G., Barletta E., Dini G., Del Rosso A., Pucci M., Cerletti M. & Del Rosso M. (2001) Cell invasion is affected by differential expression of the urokinase plasminogen activator/urokinase plasminogen activator receptor system in muscle satellite cells from normal and dystrophic patients. *Lab Invest* 81, 27- 39.
- Fidzianska A., Kaminska A. & Glinka Z. (1991) Muscle cell death. Ultrastructural differences between muscle cell necrosis and apoptosis. *Neuropatol Pol* 29, 19-28.
- Fischer, U., Janicke, R. U., Schulze-Osthoff, K. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrats. *Cell Death Differ.*, 6 (11), 1028-1042.
- Frost, C.L., Naudé, R.J., Oelofsen, W. & Muramoto, K. (1997). Purification and partial characterization of an Ostrich α_1 -Antichymotrypsin-like serum inhibitor. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 29 (4) : 595 – 603
- Fuentes-Prior P. & Salvesen G.S. (2004) The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* 384, 201-32.

G

- Gagaoua M., Boudida Y., Becila S., Picard B., Boudjellal A., Sentandreu M.A. & Ouali A. (2012) New Caspases' inhibitors belonging to the serpin superfamily: A novel key control point of apoptosis in mammalian tissues. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 03, 740-50.
- Gagaoua M., Durand D., Micol D., Santé-Lhoutellier V., Terlouw C., Ellies-Oury M.P., Boudjellal A., Hocquette J.F. & Picard B. (2014) Biomarkers of meat sensory qualities of Angus beef breed: towards the development of prediction equations. In: *15èmes JSMTV*, pp. 137-8. Viandes & Produits Carnés, Clermont-Ferrand.

- Gagaoua M., Hafid K., Boudida Y., Becila S., Ouali A., Picard B., Boudjellal A. & Sentandreu M.A. (2015a) Caspases and Thrombin Activity Regulation by Specific Serpin Inhibitors in Bovine Skeletal Muscle. *Appl Biochem Biotechnol* 177, 279-303.
- Gagaoua M., Terlouw E.M.C., Boudjellal A. & Picard B. (2015d) Coherent correlation networks among protein biomarkers of beef tenderness: What they reveal. *J Proteomics* 128, 365-74.
- Garfin, D.E., (2003). Two-dimensional gel electrophoresis : an overview, *Trends in Analytical Chemistry*, 22 (5), 263 – 272.
- Gettins P.G. (2002) Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev* 102, 4751-804.
- Gettins P.G. (2007) Mechanisms of serpin inhibition. *Molecular and cellular aspects of the serpinopathies and disorders in serpin activity*. World Scientific, New Jersey, 67-100.
- Gettins, P.G.W (2002). Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev* 102:4751–4804.
- Gianazza, E. & Arnaud, P. (1982). Chromatography of plasma proteins on immobilized Cibacron Blue F3-GA. Mechanism of the molecular interaction. *Biochem. J.* 203, 637 – 641.
- Gooptu B & Lomas DA. (2009). Conformational pathology of the serpins: themes, variations, and therapeutic strategies. *Annu Rev Biochem*;78 : 147 – 76.
- Gooptu, B., Hazes, B., Chang, W.S., Oafforn, T.R., Carrell, R.W., Read, R.J., & Lomas, D.A. (2000). Inactive conformation of the serpin alpha(1)-antichymotrypsin indicates two-stage insertion of the reactive loop: Implications for inhibitory function and conformational disease. *Proc Natl Acad Sci*, 97 : 67 – 72.
- Got, F. (1997). Accélération des processus de maturation de la viande bovine par traitements technologiques: injection de calcium; applications d’ultrasons de puissance. PhD Thesis. Université Blaise Pascal. Clermont-Ferrand, France
- Green D.R. & Reed J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-12.
- Green A. A., & Hughes W. L. (1955). [10] Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. *Methods in enzymology*, 1, 67-90.
- Guignot F. (1992) Acidification post mortem dans le muscle de veau. Conséquences sur la structure et sur les qualités organoleptiques de la viande.
- Guillemin N., Jurie C., Cassar-Malek I., Hocquette J.F., Renand G. & Picard B. (2011) Variations in the abundance of 24 protein biomarkers of beef tenderness according to muscle and animal type. *Animal* 5,885-94.

H

- Hamill R.M., McBryan J., McGee C., Mullen A.M., Sweeney T., Talbot A., Cairns M.T. & Davey G.C. (2012) Functional analysis of muscle gene expression profiles associated with tenderness and intramuscular fat content in pork. *Meat Sci* 92, 440-50.
- Haslbeck M., Miess A., Stromer T., Walter S. & Buchner J. (2005) Disassembling protein aggregates in the yeast cytosol. The cooperation of Hsp26 with Ssa1 and Hsp104. *J Biol Chem* 280, 23861-8.

- Helmersson A., von Arnold S. & Bozhkov P.V. (2008). The level of free intracellular zinc mediates programmed cell death/cell survival decisions in plant embryos. *Plant Physiology*, 147 (3) : 1158 – 1167.
- Herrera-Mendez C.H., Becila S., Blanchet X., Pelissier P., Delourme D., Coulis G., Sentandreu M.A., Boudjellal A., Bremaud L. & Ouali A. (2009) Inhibition of human initiator caspase 8 and effector caspase 3 by cross-class inhibitory bovSERPINA3-1 and A3-3. *FEBS Lett* 583, 2743-8.
- Herrera-Mendez C.H., Bremaud L., Coulis G., Pelissier P., Sentandreu M.A., Aubry L., Delourme D., Chambon C., Maftah A., Leveziel H. & Ouali A. (2006) Purification of the skeletal muscle protein Endopin 1B and characterization of the genes encoding Endopin 1A and 1B isoforms. *FEBS Lett* 580, 3477-84.
- Herve M., & Ghelis C. (1990). Conformational changes in intact and papain modified alpha 1-proteinase inhibitor induced by guanidinium chloride. *Eur J Biochem* 191 : 653 – 658.
- Holdstock J., Aalhus J.L., Uttaro B.A., López-Campos Ó., Larsen I.L. & Bruce H.L. (2014) The impact of ultimate pH on muscle characteristics and sensory attributes of the longissimus thoracis within the dark cutting (Canada B4) beef carcass grade. *Meat Science* 98, 842-9.
- Hollung K., Veiseth E., Jia X., Faergestad E.M. & Hildrum K.I. (2007) Application of proteomics to understand the molecular mechanisms behind meat quality. *Meat Sci* 77, 97-104.
- Hollung, K., Veiseth, E., Jia, X., Færgestad, E. M., & Hildrum, K. I. (2007). Application of proteomics to understand the molecular mechanisms behind meat quality. *Meat Science*, 77(1), 97-104.
- Holmes, W. E., Linen, H. R., Nelles, L., Kloft, C., Nieuwenhuis, H. K., Ruken, D. C. & Collen, D. (1987). Alpha2-antiplasmin enschede: alanine insertion and abolition of plasmin inhibitory activity. *Science*, 238, 209-211.
- Hook, V. Y. H., Purviance, R. T., Azaryan, A. V., Hubbard, G. & Krieger, T. J. (1993). Purification and characterization of alpha 1-antichymotrypsin-like protease inhibitor that regulates prohormone thiol protease involved in enkephalin precursor processing. *J. Biol. Chem.*, 268, 20570-20577.
- Hopkins, P. C. R., Carrell, R. W. & Stone, S. R. (1993). Effects of mutations in the hinge region of serpins. *Biochemistry*, 32, 7650-7657.
- Hotchkiss R.S., Strasser A., McDunn J.E. & Swanson P.E. (2009) Cell Death. *New England Journal of Medicine* 361, 1570-83.
- Huang F., Huang M., Zhang H., Zhang C., Zhang D. & Zhou G. (2016) Changes in apoptotic factors and caspase activation pathways during the postmortem aging of beef muscle. *Food Chem* 190, 110-4.
- Huber, R. & Carrell, R. W. (1989). Implications of the three-dimensional structure of alpha1-antitrypsin for structure and function of serpins. *Biochemistry* 28(23) : 8951 – 8966.
- Huntington J.A., Read R.J. & Carrell R.W. (2000) Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature* 407, 923-6.
- Huntington, J.A. (2006). Shape-shifting serpins-Advantages of a mobile mechanism. *Trends Biochem Sci* 31, 427 – 435.

- Huntington, J. A. (2011). Serpin structure, function and dysfunction. *Journal of thrombosis and haemostasis*, 9(s1), 26-34.
- Hwang S.R., Steineckert B., Toneff T., Bunday R., Logvinova A.V., Goldsmith P. & Hook V.Y. (2002). The novel serpin endopin 2 demonstrates cross-class inhibition of papain and elastase: localization of endopin 2 to regulated secretory vesicles of neuroendocrine chromaffin cells. *Biochemistry*, 41 (33) : 10397 – 10405.

I

- Im H., Ahn H.Y. & Yu M.H. (2000). Bypassing the kinetic trap of serpin protein folding by loop extension. *Protein Science*, 9 (8) : 1497 – 1502.
- Im, H., Seo, E. J. & Yu, M. H. (1999). Metastability in the inhibitory mechanism of human α 1-antitrypsin. *J. Biol. Chem.*, 274, 11072-11077.
- Irving J.A., Pike R.N., Lesk A.M. & Whisstock J.C. (2000) Phylogeny of the Serpin Superfamily: Implications of Patterns of Amino Acid Conservation for Structure and Function. *Genome Research* 10, 1845-64.

J

- Jallat, S., Tessier, L. H., Benavente, A., Crystal, R. G. & Courtney, M. (1986). Antiprotease targeting: altered specificity of alpha 1-antitrypsin by amino acid replacement at the reactive centre. *Rev Fran de Transfus Immunohematol* 29 (4) : 287 – 98.
- Jeremiah, L. E. and Gibson, L. L. (2003). The effects of postmortem product handling and aging time on beef palatability. *Food Res. Int.* 36:929–941.
- Jia X., Ekman M., Grove H., Faergestad E.M., Aass L., Hildrum K.I. & Hollung K. (2007) Proteome changes in bovine longissimus thoracis muscle during the early postmortem storage period. *J Proteome Res* 6, 2720-31.
- Jia X., Hildrum K.I., Westad F., Kummen E., Aass L. & Hollung K. (2006) Changes in enzymes associated with energy metabolism during the early post mortem period in longissimus thoracis bovine muscle analyzed by proteomics. *J Proteome Res* 5, 1763-9.
- Jia X., Hollung K., Therkildsen M., Hildrum K.I. & Bendixen E. (2006) Proteome analysis of early post-mortem changes in two bovine muscle types: M. longissimus dorsi and M. semitendinosus. *Proteomics* 6, 936-44.
- Jia X., Veiseth-Kent E., Grove H., Kuziora P., Aass L., Hildrum K.I. & Hollung K. (2009) Peroxiredoxin-6—a potential protein marker for meat tenderness in bovine longissimus thoracis muscle. *J Anim Sci* 87, 2391- 9.

K

- Kaiserman D., Whisstock J.C. & Bird P.I. (2006). Mechanisms of serpin dysfunction in disease. *Expert Rev Mol Med* 8 1-19.

- Kalapos, M. P. (1999). Methylglyoxal in living organisms: Chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicology Letters*, 110(3), 145–175.
- Katsunuma, T., Tsuda, M., Kusumi, T., Ohkubo, T., Mitomi, T., Nakasaki, H., Tajima, T., Yokoyama, S., Kamiguchi, H., Kobayashi, K., & Shinoda, H. (1980). Purification of a serum DNA binding protein (64DP) with a molecular weight of 64,000 and its diagnostic significance in malignant diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 93, 552 – 557.
- Kaufmann S.H., Mesner P.W., Samejima Jr K., Toné S. & Earnshaw W.C. (2000) [1] - Detection of DNA Cleavage in Apoptotic Cells. In: *Methods in Enzymology* (ed. by John CR), pp. 3-15. Academic Press.
- Kayalar C., Ord T., Testa M.P., Zhong L.T. & Bredesen D.E. (1996) Cleavage of actin by interleukin 1 betaconverting enzyme to reverse DNase I inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 2234-8.
- Kemp C.M. & Parr T. (2012) Advances in apoptotic mediated proteolysis in meat tenderisation. *Meat Sci* 92, 252-9.
- Kerr J.F., Wyllie A.H. & Currie A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-57.
- Kerr J.F., Wyllie A.H. & Currie A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-57.
- Kim G.D., Jeong J.Y., Moon S.H., Hwang Y.H. & Joo S.T. (2009) Influences of carcass weight on histochemical characteristics and meat quality of crossbred (Korean native black pig X Landrace) pigs. In: *Proceedings of 55th International Congress of Meat Science and Technology*, Denmark: Copenhagen.
- Kim N.K., Cho S., Lee S.H., Park H.R., Lee C.S., Cho Y.M., Choy Y.H., Yoon D., Im S.K. & Park E.W. (2008) Proteins in longissimus muscle of Korean native cattle and their relationship to meat quality. *Meat Sci* 80, 1068-73.
- Krieser R.J. & White K. (2002) Engulfment mechanism of apoptotic cells. *Current Opinion in Cell Biology* 14, 734-8.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., ... & Hengartner, M. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death & Differentiation*, 16(1), 3-11.
- Kroemer G. & Reed J.C. (2000) Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6, 513-9.
- Kroemer G. (2003) Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem Biophys Res Commun* 304, 433- 5.
- Kultz D. (2003) Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function. *J Exp Biol* 206, 3119-24.
- Kwasiborski A., Sayd T., Chambon C., Sante-Lhoutellier V., Rocha D. & Terlouw C. (2008) Pig Longissimus lumborum proteome: Part I. Effects of genetic background, rearing environment and gender. *Meat Sci* 80,968-81.

L

- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Laine, A., & Hayem, A. (1981). Purification and characterization of alpha-1-antichymotrypsin from human pleural fluid and human serum. *Biochim. Biophys. Acta* 668 : 429 – 38.
- Lametsch R., Karlsson A., Rosenvold K., Andersen H.J., Roepstorff P. & Bendixen E. (2003) Postmortem proteome changes of porcine muscle related to tenderness. *J Agric Food Chem* 51, 6992-7.
- Lametsch R., Karlsson A., Rosenvold K., Andersen H.J., Roepstorff P. & Bendixen E. (2003) Postmortem proteome changes of porcine muscle related to tenderness. *J Agric Food Chem* 51, 6992-7.
- Lametsch R., Roepstorff P. & Bendixen E. (2002) Identification of Protein Degradation during Post-mortem Storage of Pig Meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 5508-12.
- Lametsch R., Roepstorff P. & Bendixen E. (2002) Identification of Protein Degradation during Post-mortem Storage of Pig Meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 5508-12.
- Lamkanfi, M., Festjens, N., Declercq, W., Berghe, T. V., & Vandenabeele, P. (2007). Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell death and differentiation*, 14(1), 44.
- Laurell CBE, S. (1963) The electrophoretic alpha-1-globulin pattern of serum in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Scand J Clin Lab Invest* 15 : 132 – 140.
- Laville E., Sayd T., Morzel M., Blinet S., Chambon C., Lepetit J., Renand G. & Hocquette J.F.o. (2009) Proteome Changes during Meat Aging in Tough and Tender Beef Suggest the Importance of Apoptosis and Protein Solubility for Beef Aging and Tenderization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 10755-64.
- Law R.H., Zhang Q., McGowan S., Buckle A.M., Silverman G.A., Wong W., Rosado C.J., Langendorf C.G., Pike R.N., Bird P.I., & Whisstock J.C. (2006). An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol.* 7, 216–226.
- Lawrence D.A., Olson S.T., Muhammad S., Day D.E., Kvassman J.O., Ginsburg D. & Shore J.D. (2000) Partitioning of serpin-proteinase reactions between stable inhibition and substrate cleavage is regulated by the rate of serpin reactive center loop insertion into beta-sheet A. *J Biol Chem* 275, 5839-44.
- Lawrence, D.A., Ginsberg, D., Day, D.E., Berkenpas, M.B., Verhamme, I.M., J-O., K., & Shore, J.D. (1995). Serpin-protease complexes are trapped as stable acyl-enzyme intermediates. *J Biol Chem* 270, 25309 – 25312.
- Lawrence, D.A., Olson, S.T., Palaniappan, S., & Ginsburg, D. (1994). Serpin Reactive Center Loop Mobility Is Required For Inhibitor Function But Not For Enzyme Recognition. *J Biol Chem* 269 : 27657 – 27662.
- Lee C., Park S.H., Lee M.Y. & Yu M.H. (2000) Regulation of protein function by native metastability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7727-31.

- Levine B. & Yuan J. (2005) Autophagy in cell death: an innocent convict? *The Journal of Clinical Investigation* 115, 2679-88.
- Li P., Nijhawan D. & Wang X. (2004) Mitochondrial activation of apoptosis. *Cell* 116, S57-9, 2 p following S9.
- Loebermann, H.f Tokuoka, R., Deisenhofer, J. & Huber, R. (1984). Human α -1-proteinase inhibitor. *J. Mol. Biol.* 177 : 531 – 556.
- Lokanath N. K., Ohshima N., Takio K., Shiromizu I., Kuroishi, C., Okazaki N., Kuramitsu S., Yokoyama S., Miyano M., & Kunishima N. (2005). Crystal structure of novel NADP-dependent 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB8. *Journal of Molecular Biology*, 352(4), 905–917.
- Lomas, D. A., Elliott, P. R., Chang, W., Wardell, M. R. & Carrell, R. W. (1995). Preparation and characterization of latent alpha(1)-antitrypsin. *J Biol Chem* 270 : 5282 – 5288.
- Lomas, D.A., & Carrell, R.W. (2002). Serpinopathies and the conformational dementias. *Nat Rev Genet* 3, 759 – 768.
- Longo V., Lana A., Bottero M.T. & Zolla L. (2015) Apoptosis in muscle-to-meat aging process: The omic witness. *J Proteomics* 125, 29-40.
- Lubert, E. J., & Sarge, K. D. (2003). Interaction between protein phosphatase 2A and members of the importin β superfamily. *Biochemical and biophysical research communications*, 303(3), 908-913.

M

- Maltin C.A., Balcerzak D., Tilley R. & Delday M. (2003) Determinants of meat quality: tenderness. *Proc Nutr Soc* 62, 337-47.
- Marchetti P., 2005, L'apoptose : bases fondamentales et applications médicales, *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, 33, 632-641.
- Marques C., Guo W., Pereira P., Taylor A., Patterson C., Evans P.C. & Shang F. (2006) The triage of damaged proteins: degradation by the ubiquitin-proteasome pathway or repair by molecular chaperones. *Faseb J* 20, 741-3.
- Marszal E. & Shrake A. (2006). Serpin crystal structure and serpin polymer structure. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 453 (1) : 123 – 129.
- Mashima T., Naito M., Fujita N., Noguchi K. & Tsuruo T. (1995) Identification of actin as a substrate of ICE and an ICE-like protease and involvement of an ICE-like protease but not ICE in VP-16-induced U937 apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 217, 1185-92.
- Mathoniere C. (1999). Etude de la texture de la viande bovine par analyse sensorielle, enregistrements de la mastication méthodes mécaniques. PhD. Thesis. Université Blaise Pascal. Laboratoire Rheologie-Structure-Texture. Saint Genès-Champanelle, France.
- Meier, P., Finch, A. & Evan, G. (2000). Apoptosis in development. *Nature*, 407, 796-801.
- Monin G. (1988) Stress d'abattage et qualités de la viande. *Rec. Med. Vet* 164, 835-42.

- Monin, G. (2003). Abattage des porcs et qualités des carcasses et des viandes. *Productions animales*, 16(4), 251-262.
- Morzel M., Chambon C., Hamelin M., Sante-Lhoutellier V., Sayd T. & Monin G. (2004) Proteome changes during pork meat ageing following use of two different pre-slaughter handling procedures. *Meat Sci* 67, 689-96.
- 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.
- Mottonen J, Strand A, Symersky J, Sweet RM, Danley DE, Geoghegan KF, Gerard RD & Goldsmith EJ (1992). Structural basis of latency in plasminogen activator inhibitor-1. *Nature* 355 : 270 – 273.
- Mushunje A., Evans G., Brennan S.O., Carrell R.W. & Zhou A. (2004). Latent antithrombin and its detection, formation and turnover in the circulation. *Journal of thrombosis and haemostasis*, 2 (12) : 2170 – 2177.

N

- Nakanishi K., Maruyama M., Shibata T. & Morishima N. (2001) Identification of a Caspase-9 Substrate and Detection of Its Cleavage in Programmed Cell Death during Mouse Development. *Journal of Biological Chemistry* 276, 41237-44.
- Nar H, Bauer M, Stassen JM, Lang D, Gils A & Declerck PJ (2000). Plasminogen activator inhibitor 1. Structure of the native serpin, comparison to its other conformers and implications for serpin inactivation. *J Mol Biol* 297 : 683 – 695.

O

- O'Farrell, P. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, 250, 4007-4021.
- O'Brien P.J., Siraki A.G. & Shangari N. (2005) Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health. *Crit Rev Toxicol* 35, 609-62.
- Offer G. (1991) Modelling of the formation of pale, soft and exudative meat: Effects of chilling regime and rate and extent of glycolysis. *Meat Sci* 30, 157-84.
- Olson S.T. & Gettins P.G. (2011) Regulation of proteases by protein inhibitors of the serpin superfamily. *Prog Mol Biol Transl Sci* 99, 185-240.
- Ouali A. (1990) Meat Tenderization: Possible Causes and Mechanisms. A Review. *Journal of Muscle Foods* 1, 129-65.
- Ouali A. (1991) Sensory quality of meat as affected by muscle biochemistry and modern technologies. *Developments in Animal and Veterinary Sciences (Netherlands)*.
- Ouali A. & Talmant A. (1990). Calpains and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal muscles. *Meat Science*, 28 (4) : 331 – 348.

- Ouali A., Gagaoua M., Boudida Y., Becila S., Boudjellal A., Herrera-Mendez C.H. & Sentandreu M.A. (2013) Biomarkers of meat tenderness: present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanisms involved. *Meat Sci* 95, 854-70.
- Ouali A., Gagaoua M., Boudida Y., Becila S., Boudjellal A., Herrera-Mendez C.H. & Sentandreu M.A. (2013) Biomarkers of meat tenderness: present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanisms involved. *Meat Sci* 95, 854-70.
- Ouali A., Herrera-Mendez C.H., Coulis G., Becila S., Boudjellal A., Aubry L. & Sentandreu M.A. (2006) Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Sci* 74, 44-58.
- Ouali A., Herrera-Mendez C.H., Coulis G., Samira B., Boudjellal A., Harhoura K., Aubry L. & Sentandreu M.A. (2007) Meat tenderisation and muscle cell death, two highly related events. *Tehnologija Mesa* 48, 1-15.
- Ouali A., Rouchon P., Zabari M., Berri M., Zamora F. & Tassy C. (1995) Natural serine and cysteine proteinase inhibitors in bovine skeletal muscle. In *Expression of tissue proteinases and regulation of protein degradation as related to meat quality* Edited by: Ouali A, Demeyer D, Smulders FJM. Utrecht (NL): ECCEAMST,, 173 - 98.
- Ouali, A. (1976). Contribution a l'étude du rôle des protéases musculaires dans la maturation de la viande. PhD. Thesis. Université de Clermont II.
- Ouali, A. (1999). Structure and biochemistry of muscle as related to meat texture. Proc. 14th European Symposium of the Quality of Poultry Meat. *Bologna*, 1, 91-121.

P

- Pak S.C., Kumar V., Tsu C., Luke C.J., Askew Y.S., Askew D.J., Mills D.R., Brömme D. & Silverman G.A. (2004). SRP-2 is a cross-class inhibitor that participates in postembryonic development of the nematode *Caenorhabditis elegans*: initial characterization of the clade L serpins, *J Biol Chem*, 279 (15) : 15448 – 15459.
- Pappa A., Brown D., Koutalos Y., DeGregori J., White C. & Vasiliou V. (2005) Human aldehyde dehydrogenase 3A1 inhibits proliferation and promotes survival of human corneal epithelial cells. *J Biol Chem* 280, 27998-8006.
- Parmar J, & Lomas D.A. (2000). Alpha-1-antitrypsin deficiency, the serpinopathies and conformational disease. *J R Coll Physicians Lond* 34 : 295 – 300.
- Patston, P. A., Gettins, P., Beechem, J. & Schapira, M. (1991). Mechanism of serpin action: evidence that C1 inhibitor functions as a suicide substrate. *Biochemistry*, 30, 8876-8882.
- Pearce M.C., Pike R.N., Lesk A.M. & Bottomley S.P. (2007) Serpin conformations. *Molecular and Cellular Aspects of the Serpinopathies and Disorders in Serpin Activity. World Scientific*, 35-66.
- Pearce, M. C., Powers, G. A., Feil, S. C., Hansen, G, M., Parker, W., & Bottomley, S. P. (2010). Identification and Characterization of a Misfolded Monomeric Serpin Formed at Physiological Temperature. *J. Mol. Biol.* 403, 459 – 467.

- Pelissier P., Delourme D., Germot A., Blanchet X., Becila S., Maftah A., Leveziel H., Ouali A. & Bremaud L.(2008) An original SERPINA3 gene cluster: elucidation of genomic organization and gene expression in the Bos taurus 21q24 region. *BMC Genomics* 9, 151.
- Péré-Brissaud A., Blanchet X., Delourme D., Pélissier P., Forestier L., Delavaud A., Duprat N., Picard B., Maftah A. & Brémaud L. (2015) Expression of SERPINA3s in cattle: focus on bovSERPINA3-7 reveals specific involvement in skeletal muscle. *Open Biology* 5, 150071.
- Petrache, I., Fijalkowska, I., Medler, T. R., Skirball, J., Cruz, P., Zhen, L., ... & Tuder, R. M. (2006). α -1 Antitrypsin inhibits caspase-3 activity, preventing lung endothelial cell apoptosis. *The American journal of pathology*, 169(4), 1155-1166.
- Picard B., Berri C., Lefaucheur L., Molette C., Sayd T. & Terlouw C. (2010) Skeletal muscle proteomics in livestock production. *Brief Funct Genomics* 9, 259-78.
- Picard B., Gagaoua M., Micol D., Cassar-Malek I., Hocquette J.F. & Terlouw C.E. (2014) Inverse relationships between biomarkers and beef tenderness according to contractile and metabolic properties of the muscle. *J Agric Food Chem* 62, 9808-18
- Poirier J., Dumas J.-L.R., Catala M. & André J.-M. (1999) *Histologie moléculaire: texte et atlas*. Masson.
- Polati R., Menini M., Robotti E., Million R., Marengo E., Novelli E., Balzan S. & Cecconi D. (2012) Proteomic changes involved in tenderization of bovine Longissimus dorsi muscle during prolonged ageing. *Food Chemistry* 135, 2052-69.
- Pop, C., & Salvesen, G. S. (2009). Human caspases: activation, specificity, and regulation. *Journal of biological Chemistry*, 284(33), 21777-21781.
- Porzio, M. A., & Pearson, A. M. (1979). Instability of SDS-denatured proteins prepared from muscle myofibrils. *Meat science*, 3(4), 255-260.
- Potempa J., Korzus E. & Travis J. (1994) The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* 269, 15957-60.
- Purchas, R. W. (1990). An assessment of the role of pH differences in determining the relative tenderness of meat from bulls and steers. *Meat Sci.*, 27, 129-140.

R

- Rawlings, N. D., Tolle, D. P., & Barrett, A. J. (2004). Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochemical Journal*, 378, 705–716.
- Renatus M., Zhou Q., Stennicke H.R., Snipas S.J., Turk D., et al. (2000). Crystal structure of the apoptotic suppressor CrmA in its cleaved form. *Structure*. 8 : 789 – 797.
- Richards G.P., Chao L. & Chao J. (1997) Distribution of tissue kallikreins in lower vertebrates: potential physiological roles for fish kallikreins. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 118, 49- 58.
- Rodríguez-Frómata R., Rodríguez-Díaz J., Sentandreu E., Ouali A. & Sentandreu M. (2013) Proteolytic action of caspases 3 and 7 on the hydrolysis of bovine and porcine muscle myofibrillar proteins. In: *Farm animal proteomics 2013* (eds. by de Almeida A,

Eckersall D, Bencurova E, Dolinska S, Mlynarcik P, Vincova M & Bhide M), pp. 278-81. Wageningen Academic Publishers.

Roepstorff, P. & Fohlman, J. (1984). Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.*, 11, 601-609

Rouchon P. (1995) Inhibiteurs de masse moléculaire élevée des cystéine et sérine protéinases du muscle squelettique: purification et caractérisation physico-chimique et cinétique. Blaise Pascal University, Clermont Ferrand, France.

S

Sahab, Z.G., Iczkowski, K.A. & Sang, Q.X.A. (2007). Anion exchange fractionation of serum proteins versus albumin elimination. *Analytical Biochemistry*. 368 : 24 – 32.

Sancho R., Jaime I., Beltran J.A. & Roncales P. (1997) Degradation of Actin by Cathepsins in Beef Fibers Stored at -20°C. *Journal of Muscle Foods* 8, 137-46.

Schechter, I. & Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* 27 (2) : 157 – 62.

Schechter, N. M., & Plotnick, M. I. (2004). Measurement of the kinetic parameters mediating proteaseserpin inhibition. *Methods*, 32, 159–168.

Schick, C., Brömme, D., Bartuski, A. J., Uemura, Y., Schechter, N. M., & Silverman, G. A. (1998). The reactive site loop of the serpin SCCA1 is essential for cysteine proteinase inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 13465–13470.

Schwartz, B. S., & España, F. (1999). Two distinct urokinase-serpin interactions regulate the initiation of cell surface-associated plasminogen activation. *Journal of Biological Chemistry*, 274(21), 15278-15283.

Sentandreu, M. A., Coulis, G., & Ouali, A. (2002). Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends in Food Science and Technology*, 13, 400–421.

Sentandreu, M.A., Aubry, L. & Ouali, A. (2003). Purification of bovine cathepsin B : proteomic characterization of the different forms and production of specific antibodies. *Biochem. Cell. Biol.* 81, 317 – 326.

Seyama K., Nukiwa T., Takabe K., Takahashi H., Miyake K. & Kira S. (1991). A new alpha 1-antitrypsin-deficient variant with mutation on a predicted conserved residue of the serpin backbone. *Journal of Biological Chemistry*, 266 (19) : 12627 – 12632.

Shackelford S.D., Koohmaraie M., Miller M.F., Crouse J.D. & Reagan J.O. (1991) An evaluation of tenderness of the longissimus muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. *J Anim Sci* 69, 171-7.

Shieh, B. H., Potempa, J., & Travis, J. (1989). The use of alpha 2-antiplasmin as a model for the demonstration of complex reversibility in serpins. *Journal of Biological Chemistry*, 264(23), 13420-13423.

- Shishkin, S. S., Kovalev, L. I., Kovaleva, M. A., Ivanov, A. V., Eremina, L. S., & Sadykhov, E. G. (2014). The application of proteomic technologies for the analysis of muscle proteins of farm animals used in the meat industry (Review). *Applied biochemistry and microbiology*, 50(5), 421.
- Sierra V. & Olivan M. (2013) Role of mitochondria on muscle cell death and meat tenderization. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov* 7, 120-9.
- Silverman G.A., Bird P.I., Carrell R.W., Church F.C., Coughlin P.B., Gettins P.G.W., Irving J.A., Lomas D.A., Luke C.J., Moyer R.W., Pemberton P.A., Remold-O'Donnell E., Salvesen G.S., Travis J. & Whisstock J.C. (2001) The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J. Biol. Chem.* 276, 33293.
- Silverman, G. A., Whisstock, J. C., Bottomley, S. P., Huntington, J. A., Kaiserman, D., Luke, C. J. & Bird, P. I. (2010). Serpins flex their muscle I. Putting the clamps on proteolysis in diverse biological systems. *Journal of Biological Chemistry*, 285(32), 24299-24305.
- Sinha, D., Yang, X., Emig, F. & Kirby, E.P. (1994). Isolation and characterization of two protease inhibitors from bovine plasma. *J. Biochem*, 115, 387 – 391.
- Sivasothy, P., Dafforn, T. R., Gettins, P. G. & Lomas, D. A. (2000). Pathogenic alpha 1-antitrypsin polymers are formed by reactive loop-beta -sheet A linkage. *J Biol Chem* 275 (43) : 33663.
- Smili H., Gagaoua M., Becila S., Ider M., Babelhadj B., Adamou A., Picard B., Ouali A. & Boudjellal A. (2014) Exsudation de la viande de dromadaire. *Viandes et Produits Carnés*. VPC-2014-30-5-5, 1-9.
- Steenbakkens, P. J., Irving, J. A., Harhangi, H. R., Swinkels, W. J., Akhmanova, A., Dijkerman, R., ... & den Camp, H. J. O. (2008). A serpin in the cellulosome of the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2. *Mycological research*, 112(8), 999-1006.
- Stein, P. E. & Carrell, R. W. (1995). What do dysfunctional serpins tell us about molecular mobility and disease?. *Nature Struct. Biol.*, 2, 96-113.
- Stennicke H.R. & Salvesen G.S. (1999) Catalytic properties of the caspases. *Cell Death Differ* 6, 1054-9.
- Stennicke, H. R., Ryan, C. A., & Salvesen, G. S. (2002). Reprieve from execution: the molecular basis of caspase inhibition. *Trends in biochemical sciences*, 27(2), 94-101.

T

- Tarze A., Deniaud A., Le Bras M., Maillier E., Molle D., Larochette N., Zamzami N., Jan G., Kroemer G. & Brenner C. (2007) GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. *Oncogene* 26, 2606-20.
- Tassy C. (1998) Purification et caractérisation d'un inhibiteur de sérine protéinases à partir de muscle squelettique de bovin. *PhD Thesis, EPHE, Paris*.

- Tassy C., Herrera-Mendez C.H., Sentandreu M.A., Aubry L., Bremaud L., Pelissier P., Delourme D., Brillard M., Gauthier F., Leveziel H. & Ouali A. (2005) Muscle endopin 1, a muscle intracellular serpin which strongly inhibits elastase: purification, characterization, cellular localization and tissue distribution. *Biochem J* 388, 273-80.
- Taylor, R. C., Cullen, S. P., & Martin, S. J. (2008). Apoptosis: Controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(3), 231–241.
- Travis J., & Salvesen G.S. (1983). Human plasma proteinase inhibitors. *Annu Rev. Biochem*, 52 : 655 – 709.
- Travis J. & Morii, M. (1981). Human α_1 -antichymotrypsin. *Meth. Enzymol.* 80, 765 – 781.
- Travis J. & Pannell R. (1973) *Clin. Chim. Acta* 49, 49 – 52.
- Travis, J., Bowden, J., Tewksbury, D., Johnson, D. & Pannell, R. (1976). *Biochem. J.* 157, 301 – 306.
- Travis, J., Gamer, D., & Bowen, J., (1978). Human alpha-1-antichymotrypsin : purification and properties. *Biochemistry* 17: 5647 – 5651
- Travis, J., Owen, M., George, P., Carrell, R., Rosenberg, S., Hallewell, R. A. & Barr, P. J. (1985). Isolation and properties of recombinant DNA produced variants of human alpha 1-proteinase inhibitor. *J Biol Chem* 260 (7) : 4384 – 9.

V

- Valin C. (1995) Animal and muscle variability in tenderisation: Possible causes. 435-42.
- Van Genderen H.O., Kenis H., Hofstra L., Narula J. & Reutelingsperger C.P. (2008) Extracellular annexin A5: functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization. *Biochim Biophys Acta* 1783, 953-63.
- Vasiliou V., Pappa A. & Estey T. (2004) Role of human aldehyde dehydrogenases in endobiotic and xenobiotic metabolism. *Drug Metab Rev* 36, 279-99.
- Vasiliou V., Thompson D.C., Smith C., Fujita M. & Chen Y. (2012) Aldehyde dehydrogenases: From eye crystallins to metabolic disease and cancer stem cells. *Chem Biol Interact* 16, 00233-5.
- Vercammen D., Belenghi B., van de Cotte B., Beunens T., Gavigan J.A., De Rycke R., Brackenier A., Inze D., Harris J.L., & Van Breusegem F. (2006). Serpin1 of *Arabidopsis thaliana* is a suicide inhibitor for metacaspase 9. *J Mol Biol.* 364, 625 – 636.
- Verhoven B., Schlegel R.A. & Williamson P. (1995) Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med* 182, 1597-601.

W

- Wang, L. L., Han, L., Ma, X. L., Yu, Q. L., & Zhao, S. N. (2017). Effect of mitochondrial apoptotic activation through the mitochondrial membrane permeability transition pore on yak meat tenderness during postmortem aging. *Food Chemistry*, 234 (2017) 323–331
- Wardell M.R, Chang W.S, Bruce D, Skinner R, Lesk A.M, & Carrell R.W. (1997). Preparative induction and characterization of L-antithrombin: a structural homologue of latent plasminogen activator inhibitor-1. *Biochemistry* 36 : 13133 – 13142.
- Whicher, T., Bienvenu, J., & Price, C.P. (1991). Molecular biology, measurement and clinical utility of the acute phase proteins. *Pure & App Chem.*, 63, (8) : 1111 – 1116
- Whisstock, J., Skinner, R. & Lesk, A. M. (1998). An atlas of serpins conformations. *Trends Biochem. Sci.*, 23, 63-67.
- Whisstock, J.C., & Bottomley, S.P. (2006). Molecular gymnastics: Serpin structure, folding and misfolding. *Curr Opin Struct Biol* 16 : 761 – 768.
- Whisstock, J. C., Silverman, G. A., Bird, P. I., Bottomley, S. P., Kaiserman, D., Luke, C. J., ... & Huntington, J. A. (2010). Serpins flex their muscle II. Structural insights into target peptidase recognition, polymerization, and transport functions. *Journal of Biological Chemistry*, 285(32), 24307-24312.
- Williams, G. T. & Smith, C. A. (1993). Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell*, 74, 777-779.
- Wood W., Turmaine M., Weber R., Camp V., Maki R.A., McKercher S.R. & Martin P. (2000) Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos. *Development* 127, 5245-52.
- Wright, H. T. & Scarsdale, J. N. (1995). Structural basis for serpin inhibitor activity. *Proteins*, 22, 210-225. Wyllie, A. (1998). An endonuclease at least. *Nature*, 391, 20-21.
- Wu G., Farouk M.M., Clerens S. & Rosenfold K. (2014) Effect of beef ultimate pH and large structural protein changes with aging on meat tenderness. *Meat Science* 98, 637-45.

Y

- Yan, J.X., Wait, R., Berkelman, T., Harry, R.A., Westbrook, J.A., Wheeler, C.H. & Dunn, M.J. (2000). A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization- mass spectrometry. *Electrophoresis*, 21 : 3666 – 3672.
- Yang F., Sun X., Beech W., Teter B., Wu S., Sigel J., Vinters H.V., Frautschy S.A. & Cole G.M. (1998) Antibody to caspase-cleaved actin detects apoptosis in differentiated neuroblastoma and plaque-associated neurons and microglia in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 152, 379-89.
- Youle R.J. & Karbowski M. (2005) Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 657-63.
- Yu A., Byers D.M., Ridgway N.D., McMaster C.R. & Cook H.W. (2000) Preferential externalization of newly synthesized phosphatidylserine in apoptotic U937 cells is dependent on caspase-mediated pathways. *Biochim Biophys Acta* 1487, 296-308.

Z

- Zamora F., Aubry L., Sayd T., Lepetit J., Lebert A., Sentandreu M.A. & Ouali A. (2005) Serine peptidase inhibitors, the best predictor of beef ageing amongst a large set of quantitative variables. *Meat Sci* 71, 730-42.
- Zamora F., Debiton E., Lepetit J., Lebert A., Dransfield E. & Ouali A. (1996) Predicting variability of ageing and toughness in beef M. Longissimus lumborum et thoracis. *Meat Sci* 43, 321-33.
- Zamora, F. (1997). Variabilité biologique de l'attendrissage de la viande bovine: prédiction en fonction du facteur animal et du facteur type de muscle. PhD thesis, Blaise Pascal University, Clermont-Ferrand, France.
- Zamora, F. (1997). Variabilité biologique de l'attendrissage de la viande bovine: prédiction en fonction du facteur animal et du facteur type de muscle. PhD thesis, Blaise Pascal University, Clermont-Ferrand, France.
- Zapata I., Zerby H.N. & Wick M. (2009) Functional proteomic analysis predicts beef tenderness and the tenderness differential. *J Agric Food Chem* 57, 4956-63.
- Zhang M., Wang D., Huang W., Liu F., Zhu Y., Xu W. & Cao J. (2013) Apoptosis during postmortem conditioning and its relationship to duck meat quality. *Food Chem* 138, 96-100.
- Zhou, Q., Snipas, S., Orth, K., Muzio, M., Dixit, V. M. & Salvesen, G. S. (1997). Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases. *J. Biol. Chem.*, 272, 7797-7800.
- Zietkiewicz S., Krzewska J. & Liberek K. (2004) Successive and synergistic action of the Hsp70 and Hsp100 chaperones in protein disaggregation. *J Biol Chem* 279, 44376-83

Publications
et
Communications

LISTE DES PUBLICATIONS

Boudida Y., Gagaoua, M., Becila S., Picard, B., Boudjellal, A., Herrera-Mendez, C. H., Sentandreu, M. A. and Ouali, A. (2016). Serine protease inhibitors as good predictors of meat tenderness: which are they and what are their functions? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56:957–972

Rasolofoharitseheno H., MOMPI W., **Boudida Y.** & Gagaoua M. (2015) Highlighting the Degradation of Actin in Longissimus dorsi Muscle of Different Species: Bovine, Ovine, Caprine, Poultry and Freshwater Fish. *British Biotechnology Journal* 7, 169-76.

Ouali, A., Gagaoua, M., **Boudida, Y.**, Becila, S., Boudjellal, A., and Sentandreu, M. A. (2013). Biomarkers of meat tenderness: present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanisms involved. *Meat Science*, doi: 10.1016/j.meatsci.2013.05.010.

Gagaoua, M., **Boudida, Y.**, Becila, S., Picard, B., Boudjellal, A., Sentandreu, M. A., and Ouali, A. (2012). New Caspases' inhibitors belonging to the serpin superfamily: A novel key control point of apoptosis in mammalian tissues. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3, 740-750. doi:10.4236/abb.2012.326095.

COMMUNICATIONS

Boudida Y., Becila S., Gagaoua M., Boudjellal A., Sentandreu M.A., and Ouali A MUSCLE TO MEAT CONVERSION IN COMMON CARP (*Cyprinus carpio*) (2015): NEW INSIGHTS INVOLVING APOPTOSIS. . In Proceedings of the 61th International Congress of Meat Science and Technology 23-28th August 2015, Clermont-Ferrand, France.

Becila Samira, Gagaoua Mohammed, **Boudida Yasmine**, Boudjellal Abdelghani, Ouali A (2013). Marqueurs biologiques de la tendreté de la viande ovine (race Ouled Djellel). Les 11èmes Journées Internationales des Sciences Vétérinaires « Les ressources génétiques animales en Algérie » organisées les 30 novembre & 1 décembre 2013.

Gagaoua, M., Boudjellal, A., Becila, S., **Boudida, Y.**, Herrera-Mendez, C. H., Sentandreu, M. A., & Ouali, A. (2013). Apoptosis regulation in postmortem muscle: cross-class inhibition of caspases by two bovine serpins. In Proceedings of the 59th International Congress of Meat Science and Technology (pp. 4). Izmir, Turkey. ISBN: 978-605-125-720-4 <http://icomst2013.org/t/e-book/papers/poster/S6B-22.pdf>

Boudida, Y., Gagaoua, M., Smili, H., Ouali, L., Becila, S., Boudjellal, A. et Ouali, A. (2012). « Mise en évidence de quelques marqueurs d'apoptose dans le muscle post-mortem chez différents espèces : rat, volaille, ovin, caprin, camelin et bovin. » 6ème colloque « protéolyse cellulaire ». Clermont-Ferrand, 28-30 Nov, pp 63

Gagaoua, M., **Boudida, Y.**, Becila, S., Aubry, L. Boudjellal, A. et Ouali, A. (2012). « La SERPINA3, une protéine candidate dans certaines serpinopathies liées à l'apoptose ». 6ème colloque « protéolyse cellulaire ». Clermont-Ferrand, 28-30 Nov, pp 64.

ملخص

إن تغريض اللحم ظاهرة إستماتية مع إنحلال بروتيني بعد الموت بواسطة إنزيمات الكاسبيز. يتم التحكم في السيطرة الديناميكية للكاسبيز من خلال التغييرات في الظروف الفيزيائية للخلية والمثبطات الموجودة داخل الخلية. مثبطات البروتياز سيرين أو سيربين تعتبر أفضل المؤشرات الحيوية للطراوة (Zamora *et al.*, 1996 ; Zamora, 1997 ; Ouali, 1999 ; Zamora *et al.*, 2005). السربينات تثبط الكاسبيزات بشدة (Herrera-Mendez *et al.*, 2009) هذه تشكل نقطة السيطرة على موت الخلايا المبرمج.

كان الهدف الرئيسي من أطروحة لدينا هو إظهار وجود موت الخلايا المبرمج كليا في مختلف أنواع لحوم البقر وأسماك المياه العذبة من قبل العلامات التالية: تدهور البروتين أكتين المستهدفة من طرف الكاسبيزات 3؛ 2 عكس قطبية غشاء الخلية. 3 تعديل الميتوكوندريا مع إطلاق السيوكروم ج. وقد أصبحت سربينات الأبقار ودورها في تغريض اللحوم هدفا ثانويا.

لظاهرة انتشار موت الخلايا المبرمج، درسنا: 1 - عكس قطبية غشاء الخلية بواسطة المناعية. 2- تغيير الميتوكوندريا مع الإفراج عن السيوكروم ج ومتابعته بواسطة لطفة ويسترن؛ 3 - تدهور الأكتين ومتابعة الشظايا بواسطة لطفة ويسترن.

دراستنا على السربينات أدى بنا إلى إستغلال تقنيات مختلفة تم وصفها لدراستهم مستخرجة من عضلة البقر (Herrera Mendez, 2006) بما في ذلك الكروماتوغرافيا باستخدام نظام الكروماتوغرافيا السائل البروتين سريع و ستستكمل الملاحظات من أقسام الأنسجة مع المجهر الفلوري.

نتائجنا تجعل من الممكن التأكد من أن الخلية الاستماتية يستخدم آلية بروتينية مشكلة قبلها في الخلية، التي يتم تنفيذها بمجرد تلقي إشارة موت الخلايا المبرمج. وسوف تتبع هذه الإشارة عن طريق عكس قطبية الغشاء من خلال نقل الفسفوليبيدات الموجودة على الوجه الداخلي للغشاء البلازما (فوسفاتيديلزيرين) إلى الوجه الخارجي لهذا الغشاء. يزداد معدل السيوكروم ج بمرور الوقت بعد الموت مما يشير إلى أن الميتوكوندريا ربما يتم تغييرها بواسطة مسار الميتوكوندريا الداخلي. ظهور شظايا مختلفة من تدهور أكتين من 30 كدا وأقل في الأنواع المختلفة درس يجعل من الممكن اقتراح تقلب نسبة انزيم / مثبط وفقا لنوع وكفاءة نظم بروتينية.

من خلال نتائجنا، نحن نؤكد على تنفيذ عملية موت الخلايا المبرمج في خلايا العضلات، من اللحظات الأولى بعد الموت. التعديلات الأولى هي على الأرجح تتعلق بعمل الكاسبيزات.

وفيما يتعلق بسربينات الأبقار ودورها في تغريض اللحوم، تؤكد النتائج تدخلها في تثبيط قوي لكاسبيزات البدء والتنفيذ. يمكن اعتبار السربينات بعد ذلك مستويات مكملة من السيطرة على موت الخلايا المبرمج، وبالتالي علامات محتملة لرقعة اللحوم.

الكلمات المفتاحية: موت الخلايا المبرمج؛ السربينات؛ علامات بيولوجية؛ الطراوة.

Abstract

The tenderizing of meat is an apoptotic phenomenon with post-mortem proteolytic degradation involving caspases. The dynamic control of caspases is modulated by changes in the physicochemical conditions of the cell and by the inhibitors present within the cell. Inhibitors of serine proteases or serpins are then the best biomarkers of tenderness (Zamora *et al.*, 1996 ; Zamora, 1997 ; Ouali, 1999 ; Zamora *et al.*, 2005). Caspases are strongly inhibited by these serpins (Herrera-Mendez *et al.*, 2009). These constitute a point of control of apoptosis.

The main objective of our thesis was to demonstrate the ubiquity of apoptosis in different beef species and in freshwater fish by markers: 1- Degradation of actin protein target of caspases; 2-Reversal of the polarity of the cell membrane 3- Alteration of mitochondria with release of cytochrome C. A synthesis on bovine serpins and their role in meat-softening has become a secondary objective.

For the demonstration of the ubiquity of apoptosis, we studied: 1 - the inversion of the polarity of the cell membrane by immunohistochemistry, 2 - the mitochondrial alteration with release of cytochrome c and followed up by western blot; 3-degradation of actin and follow-up of fragments by Western Blot.

Our synthesis on serpins led us to reproduce the different techniques described in studies on bovine muscle (Herrera Mendez, 2006) including chromatography using the Fast Protein Liquid Chromatography System (FPLC) supplemented by observations of tissue sections with a fluorescence microscope.

Our results make it possible to confirm that the apoptotic cell uses a preformed protein mechanism in the cell, whose implementation is triggered as soon as the apoptosis signal is perceived. This signal would be emitted by a reversal of the polarity of the membrane through the translocation of phospholipids located on the inner face of the plasma membrane (phosphatidylserine) to the outer face of this membrane. The rate of cytochrome c increases over time post mortem suggesting that mitochondria are probably altered by the intrinsic mitochondrial pathway. The appearance of various fragments of actin degradation of 30 KDa and less in the different species studied makes it possible to suggest a variability of the enzyme / inhibitor ratio according to the species and the efficiency of their proteolytic systems. Through our results, we confirm the implementation of the apoptotic process in muscle cells, from the first moments post mortem. The first alterations are probably related to the action of caspases.

Concerning the bovine serpins and their role in the tenderizing of the meat, the results confirm their intervention in the strong inhibition of the initiating and executing caspases. The serpins can then be considered as complementary levels of control of the apoptotic process and therefore potential markers of the tenderness of the meat.

Key words: Apoptosis; Serpins; Biological markers; Tenderness

Résumé

L'attendrissage de la viande est un phénomène apoptotique avec dégradation protéolytique post-mortem impliquant des caspases. Le contrôle dynamique des caspases est modulé par les changements de conditions physico-chimiques de la cellule et par les inhibiteurs présents au sein de la cellule. Les inhibiteurs de protéases à sérine ou serpines constituent alors les meilleurs marqueurs biologiques de la tendreté (Zamora *et al.*, 1996 ; Zamora, 1997 ; Ouali, 1999 ; Zamora *et al.*, 2005). Les caspases sont fortement inhibées par ces serpines (Herrera-Mendez *et al.*, 2009). Ces derniers constituent un point de contrôle de l'apoptose.

L'objectif principal de notre travail de thèse était la mise en évidence de l'ubiquité de l'apoptose chez différentes espèces bouchères et chez le poisson d'eau douce par des marqueurs : 1- Dégradation de l'actine protéine cible des caspases 3 ; 2- Inversion de la polarité de la membrane cellulaire ; 3- Altération des mitochondries avec libération du cytochrome c. Une synthèse sur les serpines bovines et leur rôle dans l'attendrissage des viandes s'est imposée comme objectif secondaire.

Pour la mise en évidence de l'ubiquité de l'apoptose, nous avons étudié : 1- l'inversion de la polarité de la membrane cellulaire par immunohistochimie ; 2- l'altération des mitochondries avec libération du cytochrome c et son suivi par western blot ; 3- la dégradation de l'actine et suivi des fragments par Western Blot.

Notre synthèse sur les serpines nous a amené à reproduire les différentes techniques décrites pour leur étude à partir du muscle de bovin (Herrera Mendez, 2006) notamment la chromatographie utilisant le système Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) complétées par des observations de coupes tissulaires au microscope à fluorescence.

Nos résultats permettent de confirmer que la cellule en apoptose utilise un mécanisme protéique préformé dans la cellule et dont la mise en œuvre se déclenche dès la perception du signal d'apoptose. Ce signal serait émis par une inversion de la polarité de la membrane au travers de la translocation des phospholipides situés sur la face interne de la membrane plasmique (phosphatidylserine) vers la face externe de cette membrane. Le taux de cytochrome c augmente au cours du temps *post mortem* suggérant que les mitochondries sont probablement altérées par la voie intrinsèque mitochondriale. L'apparition de divers fragments de dégradation de l'actine de 30 KDa et moins chez les différentes espèces étudiées permet de suggérer une variabilité du rapport enzyme/inhibiteur selon les espèces et l'efficacité de leurs systèmes protéolytiques. Avec nos résultats, nous confirmons la mise en place du processus apoptotique dans les cellules musculaires, dès les premiers instants *post mortem*. Les premières altérations étant probablement liées à l'action des caspases.

Concernant les serpines bovines et leur rôle dans l'attendrissage de la viande, les résultats confirment leur intervention dans la forte inhibition des caspases initiatrices et exécutrices. Les serpines peuvent alors être considérées comme des niveaux complémentaires de contrôle du processus apoptotique et donc des marqueurs potentiels de la tendreté de la viande.

Mots clefs : Apoptose ; Serpines ; Marqueurs biologiques ; Tendreté