

CONSEQUENCE D'UNE SELECTION SUR LE PH ULTIME DE LA VIANDE SUR LA TYPOLOGIE ET LE METABOLISME ENERGETIQUE DU MUSCLE CHEZ LE POULET DE CHAIR

**Beauclercq Stéphane, Baéza Elisabeth, Bordeau Thierry, Chartrin Pascal, Godet Estelle,
Le Bihan-Duval Elisabeth, Berri Cécile**

INRA, UR83 Recherches Avicoles, F-37380 NOUZILLY, France

berri@tours.inra.fr

RÉSUMÉ

La qualité technologique de la viande de poulet n'est pas toujours maîtrisée, ce qui impacte la compétitivité de la filière. Comme chez le porc, des défauts de pH ultime (pHu), viandes acides ou à pH élevé, existent et conduisent à des problèmes d'aspect, de conservation et de rendement technologique. Afin de déterminer les causes génétiques et biologiques qui conduisent à l'apparition de ces anomalies, deux lignées de poulets ont été sélectionnées de manière divergente sur le pHu du filet : les lignées pHu- et pHu+ dont les pH moyens divergent respectivement de 0,4 et 0,2 unités pH au niveau du filet (*Pectoralis major*, PM) et de la cuisse (*Sartorius*, Sart). Dans cette étude, nous avons évalué au niveau musculaire les conséquences d'une telle sélection sur la typologie et le métabolisme oxydo-glycolytique. L'analyse histologique n'a pas mis en évidence d'effet de la sélection sur la composition en fibres musculaires. En revanche, une analyse moléculaire plus fine révèle une surexpression de l'isoforme embryonnaire de la myosine rapide dans le PM et le Sart de la lignée pHu+. Les muscles Sart de la lignée pHu+ se caractérisent également par un métabolisme oxydatif moins prononcé que celui de la lignée pHu-. Au niveau de l'expression des gènes, il a été observé dans le muscle PM de la lignée pHu+, une sous-expression de l'AMPK γ 3 et une surexpression de la PHK $\square$, deux enzymes impliquées dans la régulation de la synthèse et de la dégradation du glycogène musculaire. Ces premiers résultats indiquent que la sélection sur le pH ultime de la viande chez le poulet conduit à une réorientation partielle du métabolisme énergétique des muscles, sans modification notable de leur typologie, et s'accompagne de régulations au niveau de l'expression de deux enzymes directement impliquées dans le contrôle des réserves en glycogène musculaire.

ABSTRACT

Consequences of a selection on breast meat ultimate pH on muscle fiber typology and metabolism in broiler

The processing ability of chicken meat is not always controlled which could impact on the competitiveness of the poultry industry. As in Pig, high variations in ultimate pH (acid or high pH meat) lead to defects of appearance, conservation and technological performance. To understand the biological and genetic mechanisms involved in the control of meat quality in poultry, two chicken lines were divergently selected on the breast ultimate pH (pHu): the pHu- and the pHu+ lines. Their average pHu diverge of 0.4 pH unit in the breast *Pectoralis major* (PM) and of 0.2 pH unit in the thigh *Sartorius* (Sart) muscle. The present study aimed at evaluating the consequences of the selection on muscle fiber typology and oxydo-glycolytic metabolism. Histological analyses did not reveal any change in muscle fiber type composition. However, a deeper molecular analysis reveals an over-expression of the fast embryonic myosin isoform in the PM and Sart muscles of the pHu+ compared to the pHu- line. The Sart muscle of the pHu+ line is also characterized by a lower oxidative activity than the pHu- line. At the gene expression level, we reported in the PM muscle of the pHu+ line a down-regulation of the AMPK γ 3 and an over expression of the PHK $\square$, that are two main regulators of the synthesis and the degradation of glycogen. These preliminary results indicate that the selection for high or low pHu in broilers leads to a partial reorientation of the muscle energy metabolism, without modification of fiber typology, and is accompanied of regulations of expression of two enzymes directly involved in the control of muscle glycogen turn-over.

INTRODUCTION

La viande de poulet est majoritairement utilisée en découpe et en transformation. Pourtant, sa qualité technologique n'est pas toujours maîtrisée, ce qui impacte la compétitivité de la filière. Comme chez le porc, des défauts de pH ultime (pHu), viandes acides ou à pH élevé, existent et conduisent à des problèmes d'aspect, de conservation et de rendement technologique. Dans le cas de la production de poulets standards et lourds, l'incidence des viandes acides ($\text{pH} \leq 5,7$) a été estimée à 16% et celle des viandes à pH élevé ($\text{pH} \geq 6,1$) à 8% (abattoirs français) (Enquête INRA/ITAVI, 2008-2010). L'origine des variations de qualité résulte d'interactions complexes entre la génétique et les facteurs d'élevage et d'abattage. L'ensemble de ces facteurs vont moduler les réserves en glycogène du muscle, identifiées comme le déterminant majeur du pH ultime et de la qualité du filet chez le poulet (Le Bihan-Duval *et al.*, 2008). Afin de déterminer les causes génétiques et biologiques qui conduisent à l'apparition de ces anomalies, deux lignées de poulets ont été sélectionnées de manière divergente sur le pHu du filet : les lignées pHu- (viande acide) et pHu+ (viande à pH élevé) dont les principales caractéristiques sont présentées dans Alnahhas *et al.* (2014).

Dans cette étude qui porte sur la génération 5, les conséquences d'une telle sélection ont été évaluées sur la typologie des fibres musculaires en utilisant des techniques de marquage histologique et de RT qPCR pour quantifier l'expression des gènes codant les différentes isoformes de myosine. Le métabolisme oxydo-glycolytique musculaire a également été analysé en évaluant l'activité enzymatique de la citrate synthase, la β -hydroxyacyl-CoA-déshydrogénase et la lactate déshydrogénase (Baéza *et al.*, 1998). Enfin, pour mieux comprendre les causes des différences de pHu l'expression de plusieurs gènes qui codent pour des enzymes directement impliquées dans la synthèse ou la dégradation du glycogène a été étudiée (Figure 2) : les gènes codant pour les différentes sous-unités catalytiques ($\alpha 1$, $\alpha 2$) et régulatrices ($\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$) de l'adénosine monophosphate-activated protein kinase, la glycogène synthase, la glycogène phosphorylase et leurs régulateurs en amont, la glycogène synthase 3 kinase et la phosphorylase kinase (composée de 4 sous-unités).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Le modèle animal

Les poulets sont issus d'une sélection divergente sur le pHu du filet réalisée au Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours (PEAT, INRA Val de Loire). Deux lignées expérimentales en sont issues : la lignée pHu- dont les filets présentent un pHu très acide (en

moyenne 5,67) et la lignée pHu+ caractérisée par un pHu du filet très élevé (en moyenne 6,09).

Les poulets des deux lignées ont été élevés dans des conditions standards avec un accès *ad libitum* à l'alimentation et à l'eau. A l'âge de six semaines, après 7 h de jeun les animaux ont été abattus. Pour chaque animal, une mesure du pHu du filet (*Pectoralis major*, PM) et de la cuisse (*Sartorius*, Sart) a été réalisée à 24h post mortem. D'autres critères de qualité tels que la couleur, l'exsudat, le rendement technologique, la perte en eau et la texture après cuisson ont également été évalués (Alnahhas *et al.*, 2014). Les échantillons de PM et Sart dédiés aux analyses moléculaires ont été prélevés 15 min post-mortem, conservés à -80°C puis broyés sous azote avant analyse. Les échantillons dédiés à l'histologie ont été congelés dans de l'isopentane refroidi à l'azote liquide, puis stockés à -80°C . A la cinquième génération de sélection, sur laquelle porte l'étude, les pH moyens divergeaient respectivement de 0,4 et 0,2 unités pH au niveau des muscles PM et Sart. Les analyses ont été réalisées sur les muscles PM et Sart provenant de 24 animaux femelles (12 pHu- et 12 pHu+).

1.2. Typage des fibres musculaires

Le typage a été réalisé sur le muscle Sart de la cuisse, de type mixte oxydo-glycolytique et qui contient les 3 types principaux de fibres musculaires (I, IIA et IIB). Des coupes sériées de 10 μm ont été réalisées au cryotome puis plusieurs types de coloration ou marquage enzymologiques ont été réalisés : la coloration du réseau myofibrillaire avec l'azorubine, la révélation de l'activité de la succinate déshydrogénase (SDH), enzyme mitochondriale, permettant de distinguer les fibres présentant une forte activité oxydative de type I ou IIA des fibres IIB peu oxydatives et la révélation de l'activité ATPasique après incubation acide. Cette dernière activité permet de distinguer les fibres à contraction rapide de type II et les fibres à contraction lente de type I. Les fibres ont été classées en trois classes (Tableau 1) selon Barnard *et al.* (1982).

Tableau 1. Types de fibres musculaires chez les oiseaux (selon Barnard *et al.*, 1982)

Type	Métabolisme	ATPase (acide)	SDH
IIB	Glycolytique	-	+
IIA	Oxydo-glycolytique	-	++
I	Oxydative	+	++

1.3. Caractérisation du métabolisme oxydo-glycolytique

Pour mesurer l'activité oxydo-glycolytique des muscles PM et Sart l'activité de 3 enzymes a été évaluée : la lactate déshydrogénase (LDH) qui est un marqueur du métabolisme glycolytique, la citrate synthase (CS) et la β -hydroxyacyl-CoA-déshydrogénase (HAD) qui sont deux marqueurs du

métabolisme oxydatif. Les mesures d'activité ont été réalisées selon la méthode décrite par Bass *et al.* (1969).

1.4. Recherche d'acteurs moléculaires contrôlant le glycogène musculaire

Les analyses ont été réalisées sur des échantillons d'ARN extraits à partir de 50 mg de muscles broyés avec le kit RNA NowTM (Ozyme, St Quentin en Yvelines). Après traitement à l'ADNase et rétrotranscription en ADNc (Sibut *et al.*, 2008), les ADNc de plusieurs gènes (Tableau 2) ont été amplifiés par PCR en temps réel en utilisant un thermo cycler LightCycler 480 (Roche, Suisse) (Jlali *et al.*, 2014). Chaque échantillon a été analysé en triplicat. Pour chaque gène, un contrôle (eau) et un échantillon référence (mélange de tous les ADNc) ont été analysés. L'ARN ribosomal 18S, dont l'expression était invariante, a été choisi comme gène de référence et les niveaux d'expression de chaque gène d'intérêt exprimés en relatif par rapport à lui.

Tableau 2. Gènes amplifiés

Gènes	Abbreviations	Sous-unités
Myosin heavy chain	MyHC	Emb3, Lente 2, Neonatal, Adult
AMP-activated protein kinase	AMPK	$\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$
Glycogen synthase	GYS	
Glycogen phosphorylase	PYG	
Glycogen synthase kinase	GSK3	
Phosphorylase kinase B	PHKB	α , β , δ et γ
ARN ribosomal 18S	18S	

1.5. Analyse statistique

L'effet de la lignée sur les données issues de nos analyses a été testé sous R par le t-test de Welch qui prend en compte les différences de variance. Le seuil de signification P a été fixé à 0,05. La déviation standard de la moyenne est indiquée par une barre d'erreur dans les graphiques.

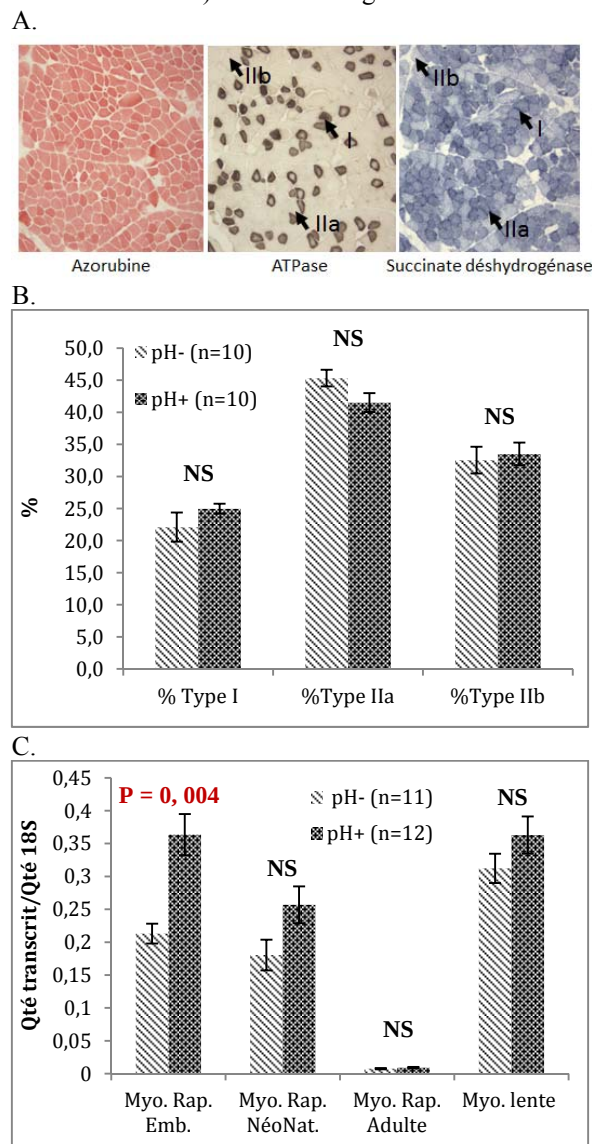
2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. La sélection n'a pas eu d'effet majeur sur la typologie du muscle Sartorius

Le typage des fibres musculaires a été réalisé uniquement dans le muscle mixte Sart car le muscle PM est composé d'un seul type de fibres, les fibres IIB à contraction rapide et métabolisme glycolytique. Dans le muscle Sart, les proportions des fibres I, IIA et IIB étaient similaires entre les lignées pHu+ et pHu-. Les fibres lentes oxydatives de type I représentaient environ un quart des fibres, les 3/4 étant des fibres à contraction rapides de type II, 40% étant de type oxydo-glycolytique (IIA) (Figure 1A et 1B). L'aire de section transversale des trois types de fibres a également été comparée et aucune différence

significative n'a été mise en évidence entre les deux lignées.

Figure 1 : Caractérisation du muscle *Sartorius* de la cuisse (A.) Typage des fibres par coloration à l'azorubine et mise en évidence des activités ATPase après incubation acide et SDH. (B.) Pourcentage des différents types de fibres en fonction de la lignée. (C.) Expression des différents isotypes rapides et lents de chaînes lourdes de myosine évaluée par RT qPCR (Rap : Rapide, Emb : Embryonnaire, NéoNat : Néonatale). NS = Non Significatif.



2.2. Les muscles de la lignée pHu+ se caractérisent par une surexpression de la forme embryonnaire de la myosine rapide

Chez le poulet, il existe 3 formes développementales de la myosine rapide qui sont respectivement majoritairement exprimées en fin d'embryogénèse (embryonnaire), autour de l'éclosion (néonatale) et plus tardivement au cours de la croissance du muscle

(adulte). Le muscle Sart exprime majoritairement les formes rapides embryonnaire et néonatale et la forme lente de myosine alors que dans le muscle PM la forme adulte de la myosine rapide est majoritaire et la forme lente pas du tout exprimée. Les muscles PM et Sart de la lignée pHu⁺ surexpriment la forme embryonnaire de myosine (+70%, $P = 0,004$ pour le Sart et +106%, $P = 0,02$ pour le PM) par rapport à ceux de la lignée pHu⁻ alors que les autres formes rapides, néonatale et adulte et la forme lente présentent des niveaux d'expression équivalents dans les deux lignées (Figure 1C, exemple du muscle Sart). Ceci peut être lié soit à une différenciation plus tardive ou à l'apparition de nouvelles fibres dans le cas des muscles de la lignée pHu⁺ comparés à ceux de la lignée pHu⁻. Ces observations pourraient être liées aux différences de réserves énergétiques (glycogène) ou de potentiel de croissance puisque la lignée pHu⁺ présentent à la fois des réserves en glycogène plus faibles et des rendements en muscles supérieurs à ceux de la lignée pHu⁻ (Alnahhas *et al.*, 2014).

2.3. La lignée pHu⁺ se caractérise par un métabolisme oxydatif plus prononcé au niveau du muscle Sart

Les enzymes HAD et CS interviennent dans le processus d'oxydation mitochondrial. La première est impliquée dans la β -oxydation des acides gras et la seconde dans la première étape du cycle de Krebs. La LDH catalyse l'inter-conversion pyruvate-lactate dans le cytoplasme et reflète le métabolisme glycolytique, plus prononcé dans le muscle PM que dans le muscle Sart. Les activités de la HAD et de la CS sont plus élevées dans les muscle Sart de la lignée pHu⁻ (+25%, $P = 0,05$ et +19%, $P = 0,008$, respectivement), indiquant un métabolisme oxydatif plus prononcé que dans la lignée pHu⁺. Les activités HAD et CS ne sont en revanche pas affectées par la sélection au niveau du muscle PM, ni les activités LDH des muscles Sart et PM. Les réserves en glycogène supérieures des muscles de la lignée pHu⁻ (Alnahhas *et al.*, 2014) pourraient donc être en partie liées à un métabolisme oxydatif plus actif, susceptible de limiter l'utilisation du glycogène et donc de favoriser son stockage par les cellules musculaires.

2.4 Les sous-unité régulatrices $\gamma 3$ de l'AMPK et β de la PHK : acteurs potentiels du contrôle du pHu chez le poulet ?

Le pHu est le résultat de la dégradation du glycogène présent dans les muscles au moment de l'abattage de l'animal par la glycolyse post-mortem qui génère de l'ATP et de l'acide lactique. Plus les réserves en glycogène sont élevées plus le pHu de la viande est acide. L'expression de plusieurs gènes qui ont un rôle prépondérant dans le turn-over du glycogène a été comparée (Figure 2). C'est le cas notamment des gènes codant pour les différentes sous-unités de

l'AMPK, qui régule à la fois la synthèse et la dégradation du glycogène. L'étude a permis de montrer que la représentation des différentes isoformes était spécifique du muscle. Ainsi, les sous-unités régulatrice $\gamma 3$ et catalytique $\alpha 2$ sont fortement exprimées dans le PM par rapport aux isotypes $\gamma 1$, $\gamma 2$ et $\alpha 1$. Au contraire dans le muscle Sart, les formes $\gamma 1$, $\gamma 2$ sont surreprésentées par rapport à la forme $\gamma 3$. Au niveau du muscle PM, l'expression de la sous-unité $\gamma 3$ est supérieure (+54%, $P = 0,05$) chez les animaux issus de lignée pHu⁻ par rapport à ceux de la lignée pHu⁺. Cette sous-unité est un senseur majeur de l'état énergétique de la cellule. Elle possède 5 domaines capables de fixer l'ATP et l'AMP. Fait intéressant, une mutation d'un de ces domaines est responsable chez le porc et également chez l'homme d'une accumulation de glycogène dans le muscle (Milan *et al.*, 2000 ; Costford *et al.*, 2007). Il s'agit du gène RN responsable chez le porc de l'apparition des viandes acides et des défauts technologiques lors de la fabrication des jambons cuits. Il paraît donc intéressant d'approfondir cette piste en recherchant notamment si des mutations présentes au sein du gène pourraient expliquer les différences de glycogène musculaire entre les lignées pHu⁺ et pHu⁻. Les expressions des autres gènes étudiés n'étaient pas altérées par la sélection, à l'exception notable de celui codant la sous-unité régulatrice β de la PHK qui était 2 fois plus exprimée ($P = 0,01$) dans le muscle Sart des pHu⁺ par rapport aux pHu⁻. En perspectives, il est envisagé d'étudier prochainement la voie de régulation faisant intervenir les serine/thréonine phosphatase 1 et 2 (Figure 2), qui exercent un effet inverse à ceux de l'AMPK et de la PHK sur le turn-over du glycogène.

CONCLUSION

Les premiers éléments de cette étude indiquent que la sélection sur le pHu musculaire chez le poulet conduit à une réorientation partielle du métabolisme énergétique des muscles sans modification notable de leur typologie. Ils suggèrent aussi que la sélection ait pu affecter l'expression des ARNm de l'AMPK $\gamma 3$ et de la PHK β , deux enzymes directement impliquées dans le contrôle du turn-over du glycogène musculaire. Ces premiers résultats doivent maintenant être confirmés, notamment dans le cadre d'une étude plus globale des lignées pHu⁺ et pHu⁻, impliquant des analyses de génomiques fonctionnelles (transcriptome musculaire, métabolome sanguin) et structurales (recherche de mutations) qui visent à identifier des marqueurs biologiques liés aux variations de qualité des viandes observées chez les volailles (programme CASDAR Optiviande).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Alnahhas N., Berri C., Boulay M., Baéza E., Jégo Y., Baumard Y., Chabault M., Le Bihan-Duval E., 2014. J. Anim. Sci., 92, 3816-3824.
2. Baéza E., Salichon M. R., Marche G., Juin H., 1998. Br Poult Sci., 39, 398-403
3. Barnard E.A., Lyles J.M., Pizzey J.A., 1982. J. Physiol., 54, 331-333.
4. Bass A., Brdiczka D., Eyer P., Hofer S., Pette D., 1969. Eur. J. Biochem., 10, 198-206.
5. Costford S.R., Kavaslar N., Ahituv N., Chaudhry S.N., Schackwitz W.S., Dent R., Pennacchio L.A., McPherson R., Harper M.E., 2007. PLoS One., 2(9):e903.
6. Jiali, M., Graulet, B., Chauveau-Duriot, B., Godet, E., Praud, C., Simoes Nunes, C., Le Bihan-Duval, E., Berri, C., Duclos, M. 2014. Br. J. Nut., 111, 2079-2088.
7. Le Bihan-Duval E., Debut M., Berri C., Sellier N., Santé-Lhoutellier V., Jégo Y., Beaumont C., 2008. BMC Genet., 189:53.
8. Milan D., Jeon J.T., Looft C., Amarger V., Robic A., Thelander M., Rogel-Gaillard C., Paul S., Iannuccelli N., Rask L., Ronne H., Lundström K., Reinsch N., Gellin J., Kalm E., Roy P.L., Chardon P., Andersson L., 2000. Science, 288, 1248-1251.
9. Sibut V., Le Bihan-Duval E., Tesseraud S., Godet E., Bordeau T., Cailleau-Audouin E., Chartrin P., Duclos M.J., Berri C., 2008. J. Anim. Sci., 86, 2888-2896.

Figure 2. Voies de régulation du glycogène musculaire et indication des gènes qui présentent des différentiels d'expression entre les muscles des lignées pHu- et pHu+.

