

ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant

**EQUIPE Croissance et Métabolisme, Unité de Recherches Avicoles, INRA,
Nouzilly**

THÈSE présentée par :

Maamer JLALI

soutenue le : **12 Juillet 2012**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie

**Etude des mécanismes moléculaires
impliqués dans les variations de qualité des
viandes de volailles**

THÈSE dirigée par :

Madame BERRI Cécile

Directeur de Recherches, INRA de Tours

RAPPORTEURS :

Monsieur BOREL Patrick

Madame MOLETTE Caroline

Directeur de Recherches, INRA/INSERM de Marseille

Maître de Conférences, HDR, ENSA de Toulouse

JURY :

Madame BERRI Cécile

Monsieur BOREL Patrick

Monsieur CHEVALIER Stéphan

Monsieur DUCLOS Michel

Monsieur GRAULET Benoit

Madame MOLETTE Caroline

Directeur de Recherches, INRA de Tours

Directeur de Recherches, INRA/INSERM de Marseille

Professeur des Universités, Université de Tours

Directeur de Recherches, INRA de Tours

Chargé de Recherches, INRA de Theix

Maître de Conférences, HDR, ENSA de Toulouse

Je dédie cette thèse

A Mes CHERS PARENTS

*A MON FRÈRE HEDI, LE PLUS PRÉCIEUX CADEAU DE MA VIE, POUR SON
SOUTIEN TOUT AU LONG DE MES ÉTUDES*

A MES FRÈRES ET SŒURS

*ET A SIHEM EN TÉMOIGNAGE DE MON AMOUR, POUR L'AIDE ET LE
SOUTIEN QU'ELLE M'A APPORTÉS SURTOUT DANS LES MOMENTS
DIFFICILES*



Remerciements

Ce travail a été effectué à l'Unité de Recherches Avicoles (URA) de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Tours-Nouzilly (France), dans l'équipe « Croissance et Métabolisme ». Il a pu être réalisé grâce à une bourse de thèse cofinancée par le ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique en Tunisie et l'INRA.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à toutes les personnes qui m'ont permis de réaliser ce travail :

C'est avec beaucoup de reconnaissance que je souhaite remercier mon directeur de thèse, **Cécile Berri**, pour la formation scientifique de qualité qu'elle m'a donné. Sa grande rigueur scientifique et sa passion pour la science m'ont beaucoup appris. Je voudrais aussi la remercier pour le temps qu'elle m'a accordé durant mon Master 2 et ma thèse. Cette thèse n'aurait pu exister sans sa grande patience, son aide, son humour et son engagement.

Je remercie sincèrement **Sophie Tesseraud** pour m'avoir permis de réaliser cette thèse dans l'équipe Croissance et métabolisme ainsi que pour ses nombreux conseils et discussions.

Je tiens à remercier également **Michel Duclos**, directeur de l'Unité de Recherches Avicoles de Nouzilly, pour m'avoir accueilli, pour son aide précieuse, notamment ses conseils et son investissement pour exploiter les résultats de ma thèse.

J'aimerais également témoigner ma gratitude envers **Benoît Graulet**, pour m'avoir accueilli à deux reprises dans son équipe à l'INRA de Theix, de m'avoir formé à la technique de chromatographie et pour sa contribution à mes travaux de doctorat. Je désire, de plus, souligner à quel point j'ai apprécié son aide et son soutien. Merci beaucoup Benoît.

Je tiens à remercier les membres de jury qui ont accepté d'évaluer ce travail de thèse :

- **Patrick Borel**, directeur de Recherches à INRA/INSERM de Marseille et **Caroline Molette**, maître de Conférences à l'ENSA de Toulouse qui ont accepté d'être rapporteurs de ce travail.
- **Cécile Berri**, directeur de Recherches à l'INRA de Tours, **Stéphan Chevalier**, professeur à l'Université de Tours, **Michel Duclos**, directeur de recherches à l'INRA de

Tours, et **Benoît Graulet**, chargé de Recherches à l'INRA de Theix, qui ont accepté d'être membres de mon jury de thèse.

Je tiens à remercier vivement aussi plusieurs personnes au sein de l'Unité de Recherches Avicoles :

- **Elisabeth Le Bihan-Duval**, pour ses commentaires et discussions au cours de cette thèse, concernant notamment le volet génétique,
- **Christophe Praud**, pour ses commentaires et discussions sur la partie de la thèse consacrée aux pigments caroténoïdes,
- **Elisabeth Baéza**, pour m'avoir transmis ses connaissances sur le métabolisme des lipides,
- **Sonia Métayer-Coustard**, pour ses connaissances sur le métabolisme énergétique et ses conseils pertinents,
- **Anne Collin**, pour ses discussions intéressantes au cours de cette thèse, essentiellement autour du métabolisme.

Je tiens aussi à remercier vivement toutes les personnes de l'équipe Croissance et Métabolisme qui m'ont aidé dans mon travail : **Thierry, Estelle, Pascal, Sabine, Estelle, Nathalie et Thomas**. Je remercie aussi **Jean-Claude Poirier** pour son aide lors des essais de purification de la protéine BCMO1 par chromatographie.

Mes remerciements les plus chaleureux à **Béatrice Chauveau-Duriot**, pour son aide dans la réalisation des dosages de caroténoïdes et de vitamines, mais aussi pour sa gentillesse et sa sympathie.

Je remercie aussi **Carlos Simões Nunes** de la société DSM pour les discussions intéressantes que nous avons eues sur les caroténoïdes et les vitamines.

Je tiens à adresser mes remerciements à toutes les personnes de l'Unité Expérimentale PEAT, particulièrement à **Nadine Sellier** et **Frédéric Mercierand**, mais également à toutes les personnes qui ont participé à l'élevage, à l'abattage, aux prélèvements et aux découpes des animaux.

Je remercie chaleureusement **Nathaëlle Wacrenier**, pour son aide apportée à la documentation

Je tiens à remercier ma famille, et tout particulièrement mes parents, mes frères et mes sœurs. Je remercie très chaleureusement mon frère **Hedi** (Hedi papa) qui m'a soutenu tout au long de mes études. Je tiens à le remercier pour sa patience, pour ses sacrifices et pour son amour infini envers moi. Je tiens à remercier **Sihem** pour son amour et pour son soutien dans les moments difficiles.

Je tiens enfin à remercier mes ami(e)s en particulier **Larbi, Kaled, Abdenaceur, Diab, Baker, Alaeddine, abderahmen, Sourour, Haroun, Imran, Khaled, Amine, Majdi, M^{ed} Ali, Chawkat, Mozamil, Abdessatter, Mahmoud, Walid, Mohamed, Mouldi, Bouzid, Ridha** et mes collègues actuels d'Adisseo.

Enfin, je tiens à adresser ma sincère reconnaissance à **Jérôme Gasnier** pour m'avoir accueilli chez lui les premiers jours de mon arrivée en France et pour son aide inoubliable.

Résumé

Plusieurs acteurs moléculaires impliqués dans les variations de qualité de la viande ont été récemment mis en évidence chez le poulet. Ma thèse a pour objectif d'approfondir l'étude de leur régulation en étudiant l'impact de facteurs alimentaires en interaction avec l'origine génétique des animaux. Il s'est articulé autour de deux thématiques qui impliquent des acteurs moléculaires et des critères de qualité de viande indépendants : le rôle de l'AMPK (AMP-activated protein kinase) dans le contrôle du turnover du glycogène musculaire et des caractères qui en dépendent (pH, rétention d'eau, couleur), et l'implication de BCMO1 (β , β -carotene-15,15'-monooxygenase) dans les variations de teneurs en pigments caroténoïdes et de coloration.

Le premier volet de la thèse s'est intéressé à la régulation du glycogène musculaire qui chez le poulet, comme chez d'autres espèces, constitue un élément déterminant de la qualité technologique des viandes. Il conditionne la chute de pH post-mortem et de ce fait la capacité de rétention d'eau, la couleur, et les rendements technologiques. Notre étude montre qu'une restriction en protéines alimentaires (17% vs 23%) a pour conséquence de stimuler les voies impliquées dans l'utilisation du glycogène musculaire, en particulier chez des animaux présentant des dépôts adipeux réduits. La réponse accrue de ce type d'animaux pourrait être liée à leur moindre capacité à stocker le glycogène, avec des activités enzymatiques (activation de l'AMPK et inhibition de la glycogène synthase) qui, respectivement, altèrent sa synthèse et stimulent sa dégradation *in situ*. Au-delà de l'amélioration des connaissances sur la compréhension des mécanismes physiologiques qui régulent les réserves énergétiques du muscle, nos résultats ouvrent des perspectives d'études intéressantes pour mieux comprendre les lois de réponse du métabolisme énergétique musculaire en fonction de l'apport alimentaire et des besoins des animaux.

Le deuxième volet de la thèse s'est intéressé à la régulation de la teneur en caroténoïdes du muscle et la couleur de la viande, en lien avec un polymorphisme récemment identifié dans le promoteur du gène BCMO1. Nous avons validé le lien de causalité entre les variations d'expression de BCMO1 et la teneur en pigments xanthophylles (lutéine et zéaxanthine) et la coloration jaune du filet. Nous avons en revanche montré que les effets du polymorphisme sont restreints au muscle P. major du filet, suggérant l'intervention de facteurs de transcription tissu-spécifiques ou d'interactions avec d'autres facteurs (nutritionnels par exemple) qui moduleraient l'impact de la mutation dans les autres tissus étudiés (duodénum et foie,

notamment). Ainsi, nous avons montré que la conversion du β -carotène en vitamine A au niveau du duodénum serait différente entre génotypes, induisant ainsi des modulations de compétition entre micronutriments qui expliquerait en partie les différences de phénotypes observés en lien avec le polymorphisme. Ceci concerne plusieurs types de caractères incluant, les teneurs plasmatiques ou tissulaires en pigments xanthophylles, en vitamine A et E, en cholestérol, et la croissance des animaux. Des études complémentaires sont toutefois nécessaires pour élucider complètement le mécanisme d'action de la mutation.

En conclusion, les résultats de la thèse soulignent la possibilité de moduler efficacement les caractères de qualité de viande *via* l'alimentation, avec des réponses qui dépendent cependant des caractéristiques génétiques et physiologiques des animaux. Au-delà de la compréhension des mécanismes qui régulent la qualité, nos travaux contribueront à terme à la mise en place de nouvelles stratégies de production permettant d'optimiser la qualité du poulet de chair en réponse aux attentes de la filière et des consommateurs.

Mots clefs : Qualité des viande, glycogène, caroténoïdes, AMP-activated protein kinase, β , β -carotene-15,15'-monooxygenase, nutrition, génétique, poulet.

Résumé en anglais

Several molecular mechanisms involved in the changes in meat quality were recently identified in chickens. My thesis aims to further study their regulation by studying the impact of dietary factors in interaction with the genetic origin of animals. It was structured around two themes that involve independent molecular mechanisms and meat quality criteria: the role of AMPK (AMP-activated protein kinase) in the control of muscle glycogen turnover and related meat quality traits (pH, water retention, color), and the involvement of BCMO1 (β , β -carotene-15, 15'-monooxygenase) variations in levels of carotenoid pigments and color.

The first part of the thesis has focused on the regulation of muscle glycogen that in chickens, as in other species, is a key element of the technological quality of meat. It conditions the pH fall postmortem and thus the water holding capacity, color, and processing yields. Our study shows that dietary protein restriction (17% vs. 23%) stimulates the pathways involved in muscle glycogen degradation, particularly in animals with reduced fat deposition. The increased response of such animals could be related to their reduced ability to store glycogen, with enzymatic activities (AMPK activation and inhibition of glycogen synthase) which, respectively, alter its synthesis and stimulate its degradation *in situ*. Beyond the improvement of knowledge on understanding the physiological mechanisms that regulate muscle energy reserves, our results open interesting perspectives for studies to better understand the regulation of energy metabolism in muscle in interaction with dietary supply and animal needs.

The second part of the thesis has focused on the regulation of muscle carotenoid content and meat yellow color, in connection with a recently identified polymorphism in the promoter of the BCMO1 gene. We validated the causal link between changes in BCMO1 mRNA level, xanthophyll (lutein and zeaxanthin) content, and yellow color of breast meat. We have however shown that such effects are restricted to the breast P. major muscle, suggesting the involvement of tissue-specific transcription factors or interactions with other factors (eg nutritional), that could modulate the impact of the mutation in the other tissues examined (duodenum and liver, in particular). Thus, we show that the conversion of β -carotene into vitamin A in the duodenum would be different between genotypes, thus inducing modulations of competition between micronutrients that may partly explain the differences in phenotypes observed in connection with the polymorphism. This involves several types of characters including: plasma or tissue concentrations of xanthophyll, of vitamin A and E, of cholesterol,

and animal growth. Further studies are still needed to fully elucidate the mechanism of action of the mutation.

In conclusion, the results of the thesis emphasize the ability to effectively modulate poultry meat quality traits through nutrition, but also the need to take into account the genetic and physiological characteristics of animals that modulates the nutritional effects. Beyond understanding the mechanisms that regulate the meat quality, our work contribute to the eventual setting up of new production strategies to optimize the quality of broilers in response to the expectations of the poultry industry and consumers.

Key words: Meat quality, glycogen, caroténoids, AMP-activated protein kinase, β , β -carotene-15,15'-monooxygenase, nutrition, genetic, chicken.

Table des matières

Table des matières

Remerciements	1
Résumé	5
Résumé en anglais	8
Table des matières	11
Liste des publications	16
Liste des abréviations françaises	21
Liste des abréviations anglaises	24
Liste des tableaux, figures et annexes	27
Liste des tableaux	28
Liste des figures	29
Liste des annexes	31

INTRODUCTION	32
---------------------	----

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	36
------------------------------	----

Partie A. La production de volailles de chair	37
--	----

I. Evolution de la production de viande de volailles	37
--	----

II. Segmentation du marché français	38
-------------------------------------	----

II.1. Diversité des espèces avicoles	38
--------------------------------------	----

II.2. Diversité des modes de production avicole	38
---	----

II.3. Diversité des produits issus de la production avicole de chair	39
--	----

II.4. Maîtrise de la qualité des produits	40
---	----

Partie B. Muscle squelettique et sa transformation en viande	41
---	----

I. Muscle squelettique	41
------------------------	----

I.1. Généralités sur la structure du muscle squelettique	41
--	----

I.2. Typologie des fibres musculaires	43
---------------------------------------	----

I.3. Composition chimique	45
---------------------------	----

I.4. Métabolisme musculaire	47
-----------------------------	----

II. Transformation du muscle en viande : les principales modifications physico-chimiques	48
--	----

II.1. Réactions biochimiques et évolution du pH	48
---	----

II.2. Modifications physiques et mécaniques	50
---	----

III. Principaux indicateurs de la qualité technologique	51
III.1. Le pH post-mortem de la viande	51
III.2. La couleur de la viande	54
III.3. Le pouvoir de rétention d'eau	56
III.4. Texture	58
III.5. Variabilité de qualité observée sur le terrain	61
Partie C. Le glycogène musculaire : facteur déterminant de la qualité de la viande	62
I. Principales voies métaboliques impliquées dans le métabolisme du glycogène	63
I.1. La glycogénogenèse	63
I.1.1. La glycogène synthase (GYS)	64
I.1.2. La glycogène synthase kinase 3 (GSK-3)	65
II. La glycogénolyse	66
II.1. La glycogène phosphorylase kinase (PHK)	67
II.2. Les phosphofructokinases (PFK)	68
II.3. La glycogène phosphorylase (PYG)	69
III. L'AMP-activated protein kinase (AMPK) : régulateur clef du métabolisme du glycogène	69
III.1. Structure et propriétés	69
III.2. Régulation du métabolisme du glycogène par l'AMPK	71
IV. AMPK et qualité de la viande	72
Partie D. Les caroténoïdes : facteurs déterminants de la couleur	74
I. Généralités	75
II. Métabolisme des caroténoïdes	76
II.1. Absorption	77
II.2. Transport des caroténoïdes dans le sang	79
II.3. Distribution tissulaire des caroténoïdes	81
III. Régulation moléculaire du métabolisme des caroténoïdes	83
III.1. Scavenger receptor class B type I (SR-BI)	83
III.2. Cluster déterminant 36 (CD36)	84
III.3. Les transporteurs ABC	85
III.4. β , β -carotène 15,15'-monooxygénase 1 (BCMO1)	85
III.5. β , β -carotène 9',10'-dioxygénase 2 (BCDO2)	86
III.6. Intestine specific homeobox (ISX)	87

IV. Facteurs régulateurs du métabolisme des caroténoïdes	88
IV.1. Facteurs alimentaires	88
IV.1.1. La nature des caroténoïdes alimentaires	88
IV.1.2. Caroténoïdes et autres micronutriments liposolubles présents dans la ration alimentaire	89
IV.1.3. Le statut en vitamine A	90
IV.1.4. Les lipides alimentaires	91
IV.1.5. Les protéines alimentaires	92
IV.1.6. Les fibres alimentaires	93
IV. 2. Facteurs génétiques	93
V.7. Impact des apports en caroténoïdes et en vitamine A sur la coloration des tissus	95
RESULTATS	97
VOLET 1 : Régulation du métabolisme du glycogène musculaire et conséquence pour la qualité technologique	100
I.1. Introduction	100
I.2. Dispositif expérimental et mesures	101
I. 3. Résultats de l'étude (article 1)	102
I. 4. Discussion	113
I.4.1. Principales caractéristiques des deux lignées étudiées	113
I.4.2. Mécanismes moléculaires impliqués dans les variations de qualité des viandes	114
I.4.3. Apport de notre étude dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle de la teneur en glycogène du muscle	116
I.4.4. Conclusions et perspectives	117
VOLET 2 : Régulation du métabolisme des caroténoïdes et conséquence pour la coloration de la viande	119
II.1. Introduction	119
II.2. Découverte de la mutation au locus BCMO1	120
II.3. Production des variants génétiques	122
II.4. Plans expérimentaux	123
II. 5. Principaux résultats de l'étude (article 2)	124
II.6. Discussion	152
II.6.1. Intérêt du modèle expérimental	152

II.6.2. Distribution tissulaire du gène BCMO1 chez le poulet	152
II.6.2. Mise en évidence d'un mode d'action de la mutation tissu-spécifique	153
II.6.3. Comment la mutation affecte le statut en xanthophylles du muscle et du plasma ?	154
II.6.4. Implication de la mutation pour le statut vitaminique et le développement corporel des animaux.	156
II.6.5. Conclusions et perspectives	157
II. 7. Principaux résultats de l'étude 2 (article 3)	158
II.8. Discussion	190
II.8.1. Impact du polymorphisme	190
II.8.2. Impact de l'apport en β -carotène	191
II.8.3. Effets interactifs : vers une compréhension des mécanismes	192
II.8.4. Conclusion	194
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	195
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	203
ANNEXE : Matériels & Méthodes	230

Liste des publications

2012 :

Baéza, E; Arnould, C; **Jlali, M**; Chartrin, P; Gigaud, V; Mercierand, F; Durand, C; Méteau, K; Le Bihan-Duval, E; Berri, C. ; 2012. Influence of increasing slaughter age of chickens on meat quality, welfare and technical and economic results. Journal of Animal Science 2011 Dec 28. [Epub ahead of print]

Jlali, M.; Gigaud, V.; Métayer-Coustard, S.; Sellier, N.; Tesseraud, S.; Le Bihan-Duval, E.; Berri, C.; 2012. Modulation of glycogen and breast meat processing ability by nutrition in chickens: impact of crude protein level in two chicken genotypes. Journal of Animal Science, 90 :447-455.

Jlali, M.; Graulet, B.; Chauveau-Duriot, B.; Chabault, M.; Godet, E.; Leroux, S. ; Praud, C. ; Le Bihan-Duval, E.; Duclos, M.J. ; Berri, C.; 2012. A mutation in the promoter of the chicken BCMO1 gene alters xanthophylls metabolism through a selective effect on its mRNA levels in the breast muscle. Journal of Animal Science, en révision.

Communications à des congrès scientifiques – Oral

2010 :

Baéza, E.; **Jlali, M.**; Chartrin, P.; Gigaud, V.; Mercierand, F.; Durand, C.; Méteau, K.; Le Bihan-Duval, E.; Berri, C.; 2010. Influence of increased slaughter age on meat yield and breast meat quality from a heavy line of broiler chicken. 13. European Poultry Conference Tours (FRA), 5 p.

Jlali, M.; Godet, E.; Chabault, M.; Leroux, S.; Graulet, B.; Praud, C.; Pitel, F.; Le Bihan-Duval, E.; Duclos, M.J.; Berri, C.; 2010. Consequence for growth, carotenoid metabolism and breast meat colour of a polymorphism in the beta, beta-carotene 15,15-monooxygenase (BCMO-1) chicken gene. 13. European Poultry Conference Tours; (FRA); 2010/08/23-27, 4 p.

Praud, C.; Voldoire, E.; Godet, E.; Chabault, M.; Leroux, S.; **Jlali, M.**; Graulet, B.; Pitel, F.; Le Bihan-Duval, E.; Berri, C.; Duclos, M.; 2010. BCMO-1 gene expression in chicken muscle cells in vitro is under genetic control. 13. European Poultry Conference Tours (FRA); 2010/08/23-27, 3 p.

2009 :

Bedrani, L.; Berri, C.; Grasteau, S.; Jegou, Y.; Yahav, S.; Everaert, N.; **Jlali, M.**; Joubert, R.; Métayer-Coustard, S.; Praud, C.; Temim, S.; Tesseraud, S.; Collin, A.; 2009. Effects of embryo thermal conditioning on thermotolerance, parameters of meat quality and muscle energy metabolism in heavy line of chicken. The 4th Workshop on Fundamental Physiology and Perinatal Development in Poultry; Bratislava (SLO); 2009/09/10-12; WPSA, Slovaquie.

Berri, C.; Le Bihan-Duval, E.; Sibut, V.; **Jlali, M.**; Gigaud, V.; Duclos, M.J.; 2009. Improving meat quality by regulating animal feeding and genetics: recent advances in poultry. International Conference on FoodOmics; Cesena (ITA); 2009/05/28-29, 3.

Communications à des congrès scientifiques (Poster)

2011 :

Praud, C.; Voldoire, E.; Godet, E.; Chabault, M.; Leroux, S.; **Jlali, M.**; Graulet, B.; Pitel, F.; Le Bihan-Duval, E.; Berri, C.; Duclos, M.; 2011. Genetic control of BCMO-1 gene expression in chicken muscle cells. 4. International Congress of Myology ; Lille (FRA) ; 2011/05/9-13 ; AFM, p 169 poster 466.

Communications à des journées professionnelles

2011 :

Baéza, E.; **Jlali, M.**; Chartrin, P.; Gigaud, V.; Mercierand, F.; Durand, C.; Meteau, K.; Le Bihan-Duval, E.; Berri, C.; 2011. Augmentation de l'âge à l'abattage d'une souche lourde de poulet et conséquences sur le rendement et la qualité de la viande. In : 9. Journées de la Recherche Avicole. Synthèses et textes résumés. 9. Journées de la Recherche Avicole ; Tours (FRA) ; 2011/03/29-30, 245 (texte intégral de 5 p. sur CD-Rom p 714-717); ITAVI.

Jlali, M.; Graulet, B.; Godet, E.; Chabault, M.; Leroux, S.; Chauveau-Duriot, B.; Praud, C.; Pitel, F.; Simoes Nunes, C.; Le Bihan-Duval, E.; Duclos, M.J.; Berri, C.; 2011. Impact du polymorphisme du gène BCMO1 et de l'apport en bêta-carotène sur le métabolisme des caroténoïdes et la couleur du filet chez le poulet. In : 9. Journées de la Recherche Avicole. Synthèses et textes résumés. 9. Journées de la Recherche Avicole ; Tours (FRA) ; 2011/03/29-30, 233 (texte intégral de 5p. sur CD-Rom p 659-662); ITAVI.

2009 :

Fernandez, X.; Berri, C.; **Jlali, M.**; Molette, C.; Hazard, D.; El Rammouz, R.; Wadih-Moussa, Z.; Rémignon, H.; 2009. Caractérisation des réponses du muscle à un stress de transport-contention chez le poulet. 2. Métabolisme musculaire et indicateurs de qualité des viandes. 8èmes Journées de la Recherche Avicole ; St Malo (FRA) ; 2009/03/25-26, 148 (Résumé). CDRom : 000176.pdf, 542-546; ITAVI, Paris (FRA).

Jlali, M.; Sibut, V.; Gigaud, V.; Sellier, N.; Tesseraud, S.; Métayer-Coustard, S.; Duclos, M.J.; Le Bihan-Duval, E.; Berri, C.; 2009. Régulation du glycogène musculaire et relation avec la qualité de la viande de poulet. 8ème Journées de la Recherche Avicole ; St Malo (FRA) ; 2009/03/25-26, 142 (Résumé). CDRom : 000077.pdf, 512-516; ITAVI, Paris (FRA).

Communications invitées

2011 :

Duclos, M.J.; Berri, C.; Le Bihan-Duval, E.; Gigaud, V.; Baéza, E.; **Jlali, M.**; Sibut, V.; 2011.

Combining genetics and genomics for understanding and reducing the variability of poultry meat quality. 20th European Symposium on the Quality of Poultry Meat; Leipzig (DEU); 2011/09/04-08 ; WPSA, 9 p.

2010 :

Berri, C.; **Jlali, M.**; Baéza, E.; Métayer-Coustard, S.; Tesseraud, S.; Gigaud, V.; Le Bihan-Duval, E.; 2010. Efeitos da nutrição sobre a qualidade de carcaça de franco de corte - Improving meat quality by regulating animal feeding recent advances in poultry. 11. Simposio Brasil Sul de Avicultura e 2. Brasil sul Poultry Fair; Chapeco (BRA) ; 2010/04/06-08, 84-94.

Liste des abréviations françaises

a* : indice de rouge

ACC : acétyl-CoA carboxylase

ADN: acide désoxyribonucléique

ADNc: acide désoxyribonucléique complémentaire

ADP : adénosine diphosphate

AICAR: 5-aminoimidazole 4-carboxamide 1-β-D ribofuranoside

Akt: protéine kinase B

AMP: adénosine-5'-monophosphate

AMPC : adénosine monophosphate cyclique

Apo-A-I: apo-lipoprotéine A-I

ARNm: acide ribonucléique messenger

ATP: adénosine-5'-triphosphate

b* : indice de jaune

BCDO2: beta, beta-carotène 9',10'-dioxygénase

BCMO1: beta, beta-carotène 15,15'-monooxygénase

Bio: biologique

Ca : calcium

CQC: critère qualité certifié

Fe: fer

Fru-2,6-DP : fructose-2,6-diphosphate

Fru-6-P : fructose-6-phosphate

G-6-P : glucose-6-phosphate

GAPDH: glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase

GK : glucokinase

GSK3: glycogène synthase kinase-3

GYS: glycogène synthase

IMP : inosine monophosphate

ITAVI: Institut Technique de l'Aviculture

kDa: kilodalton

kg: kilogramme

L* : luminance

LPL: lipoprotéine lipase

MAT: matières azotées totales

MG: matière grasse
NAD: nicotinamide adénine dinucléotide
 NH_4^+ : ion ammonium
PCr: phosphocréatine
PFK: phosphofructokinase
pH: potentiel hydrogène
pH15 : pH mesuré à 15 min *post-mortem*
PHK : glycogène phosphorylase kinase
PHK: phosphorylase kinase
pHu : pH ultime
Pi : phosphate inorganique
PI-3K : phosphatidylinositol-3-kinase
P. major : *Pectoralis major*
PP-1: protéine phosphatase-1
PRE: pouvoir de rétention d'eau
PYG: glycogène phosphorylase
Repab: règlement européen pour les productions animales biologiques
SDH : succinate déshydrogénase
Ser: sérine
Thr: thréonine
UDP: uridine diphosphate
UE: Union Européenne
URA: Unité de Recherches Avicoles
UTP : uridine triphosphate
V: volt

Liste des abréviations anglaises

ABC: ATP-binding cassette transporters
ABCA1: ATP-binding cassette transporter A1
ABCG5: ATP-binding cassette G5
AICAR: 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside
AMPK (PRKA): AMP-activated protein kinase
AMPKK: AMP-activated protein kinase kinase
BCDO2: beta, beta-carotene-9',10'-dioxygenase
BCMO1: beta, beta-carotene-15,15'-monooxygenase
CaMKK: Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase
CD36: cluster determinant 36
DFD: Dark Firm Dry
FAO: Food and Agriculture Organization
FTG: fast twitch glycolytic
FTOG: fast twitch oxido-glycolytic
GLUT: glucose transporters
HDL: high density lipoprotein
HPLC: high performance liquid chromatography
IDL: intermediate density lipoprotein
ISX: intestine specific homeobox
IUB: International Union of Biochemistry
IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry
KO: knock out
LDL: low density lipoprotein
MEF2: myocyte enhancer factor 2
mTOR: mammalian target of rapamycin
P70S6K: P70S6 kinase
PCR: polymerase chain reaction
PPARE: peroxisome proliferator-activated response element
PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PRKAG3: AMP-activated protein kinase subunit gamma-3
PSE: Pale, Soft & Exudative
QTL: Quantitative trait loci
RAR: acid retinoic receptor

RT: reverse transcriptase
RT-PCR: real-time-polymerase chain reaction
RXR: retinoids X receptors
S6: ribosomal S6 kinase
SDS: sodium dodecyl sulphate
SNP: single nucleotide polymorphism
SR-BI: scavenger receptor class B type I
STO: slow twitch oxidative
UPLC: ultra-high performance liquid chromatography
VLDL: very low density lipoprotein

Liste des tableaux et figures

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales productions mondiales de viande de volailles (en millions de tonnes équivalent carcasse)

Tableau 2 : Principales productions de viande de volailles dans l'Union Européenne à 27 (en milliers de tonnes équivalent carcasse)

Tableau 3 : Evolution de la production française de volailles par espèce (en milliers de tonnes équivalent carcasse)

Tableau 4 : Caractéristiques des différents types de fibres musculaires

Tableau 5 : Nomenclatures des types de fibres musculaires chez les oiseaux

Tableau 6 : Variation de la composition chimique des viandes entre certaines espèces

Tableau 7 : Différents types de protéines musculaires

Tableau 8 : Variabilité du potentiel glycolytique (PG) dans le muscle de poulet en fonction du type de muscle, de la souche et du type de production

Tableau 9 : Variabilité des paramètres de couleur¹ (L*, a*, b*) du muscle P. major de poulet de la souche et du type de production

Tableau 10 : Principales caractéristiques des lipoprotéines chez les volailles

Tableau 11 : Les différentes caractéristiques biochimiques de l'enzyme BCMO1 chez plusieurs espèces

Tableau 12: Effets de la vitamine A sur l'expression génique ou l'activité enzymatique de BCMO1

Tableau 13 : Substrats dont les concentrations sont affectées par des variants (SNPs) génétiques de différentes protéines¹ impliquées dans le métabolisme des caroténoïdes

Table 14 : Caractéristiques corporelles et du muscle P. major des lignées expérimentales maigres (Lean Line) et grasses (Fat Line)

Tableau 15 : Caractéristiques des lignées HG et LG et de leur croisement de type F2 abattus à l'âge de 9 semaines

Liste des figures

Figure 1. Consommation par type de production et type de produit

Figure 2. Anatomie du muscle squelettique au niveau macroscopique et microscopique

Figure 3. Caractérisation des fibres musculaires sur coupes sériées de muscle *Sartorius* (partie mixte) de poulet

Figure 4. Métabolisme énergétique de la contraction musculaire

Figure 5. Cinétiques de chute de pH dans le muscle P. major de poulets issus de différents types de production : Label Rouge, certifiée, standard

Figure 6 : Représentation de la mesure de la couleur dans le système CIELAB (L^* = luminosité (0 = noir, 100 = blanc), a^* = indice de rouge, b^* = indice de jaune)

Figure 7. Impact de la cinétique de chute de pH *post-mortem* sur les caractéristiques de la du filet de poulet

Figure 8. Variabilité par type de production du pH ultime de filets de poulets mesuré en abattoir industriel ($n \approx 8000$)

Figure 9. Fréquence d'apparition des défauts de qualité de viande liés aux variations de pH ultime dans les abattoirs français (enquêtes 2008 à 2010, $n \approx 8000$)

Figure 10. Structure schématique du glycogène

Figure 11. Transformation du glycogène (n résidus) en glycogène ($n + 1$ résidus) catalysée par la glycogène synthase (GYS)

Figure 12. Glycogène synthase (GYS)

Figure 13. Activateurs et inhibiteurs de la conversion du fructose-6-phosphate (Fru-6-P) en fructose-1,6-diphosphate (Fru-1,6-DP) par la phosphofructokinase-1 (PFK-1)

Figure 14. Distribution et fonctions l'AMP-activated protein kinase (AMPK)

Figure 15. Activation de l'AMPK (A) et modèle d'association de ses sous-unités en absence (B) ou en présence d'AMP (C)

Figure 16. Activateurs et inhibiteurs de l'AMP-activated protein kinase (AMPK)

Figure 17. Structure des principaux caroténoïdes

Figure 18. Différentes voies d'absorption des caroténoïdes (A)

Figure 19. Clivage du β -carotène

Figure 20. Régulation de l'absorption intestinale des caroténoïdes, des lipides, des vitamines A et E par la protéine ISX

Figure 21. Profils de vraisemblance des QTL pour les valeurs de rouge (a^*) et jaune (b^*) et des eQTL pour l'expression brute ou relative par rapport au 18S de BCMO1

Figure 22. Polymorphismes (SNP) dans le promoteur du gène BCMO1 (-817 à 41 pb)

Figure 23. Dispositif expérimental (article 1)

Figure 24. Voies de signalisation étudiées qui sont impliquées dans la régulation du turnover du glycogène et de la synthèse protéique dans le muscle squelettique.

Figure 25. Schéma des voies potentiellement impliquées dans le contrôle du glycogène musculaire chez le poulet.

Figure 26. Principales étapes qui ont conduit à la mise en évidence de la double-mutation dans le promoteur du gène BCMO1

Figure 27. (A) Courbes de fusion correspondant aux différents génotypes (homozygotes GG ou AA, hétérozygotes AG. (B) Localisation des deux SNP fonctionnels dans le promoteur du gène BCMO1 de poulet

Figure 28. Dispositif expérimental correspondant à l'article 2

Figure 29. Absorption et transport des caroténoïdes

Figure 30. Dispositif expérimental correspondant à l'article 3

Figure 31. Variabilité inter-tissulaire de l'expression de BCMO1 (ARNm (A), protéine (B)).

Figure 32. Positionnement des peptides (en vert) qui ont servi à l'immunisation des lapins pour la production de l'anticorps polyclonal anti-CMO1.

Figure 33. Electrophorèse 2D d'extrait protéique de foie de poulet. Immunomarquage avec l'anticorps anti-BCMO1.

Figure 34. Corrélations entre les niveaux en ARNm de BCMO1 (relatif au 18S), la teneur en pigments xanthophylles (lutéine + zéaxanthine) et la couleur b* dans le muscle P. major du filet.

Figure 35. SNP et site de fixation aux facteurs de transcription dans le promoteur de BCMO1.

Figure 36. Variabilité inter-tissulaire de l'expression en ARNm de SCARB1 et CD36.

Liste des annexes

Annexe 1 – **Jlali, M.**; Sibut, V.; Gigaud, V.; Sellier, N.; Tesseraud, S.; Métayer-Coustard, S.; Duclos, M.J.; Le Bihan-Duval, E.; Berri, C.; 2009. Régulation du glycogène musculaire et relation avec la qualité de la viande de poulet. 8ème Journées de la Recherche Avicole ; St Malo (FRA) ; 2009/03/25-26, 142 (Résumé). CDRom : 000077.pdf, 512-516; ITAVI, Paris (FRA).

Annexe 2 – **Jlali, M.**; Godet, E.; Chabault, M.; Leroux, S.; Graulet, B.; Praud, C.; Pitel, F.; Le Bihan-Duval, E.; Duclos, M.J.; Berri, C.; 2010. Consequence for growth, carotenoid metabolism and breast meat colour of a polymorphism in the beta, beta-carotene 15,15-monooxygenase (BCMO-1) chicken gene. 13. European Poultry Conference Tours; (FRA); 2010/08/23-27, 4 p.

Annexe 3 – **Jlali, M.**; Graulet, B.; Godet, E.; Chabault, M.; Leroux, S.; Chauveau-Duriot, B.; Praud, C.; Pitel, F.; Simoes Nunes, C.; Le Bihan-Duval, E.; Duclos, M.J.; Berri, C.; 2011. Impact du polymorphisme du gène BCMO1 et de l'apport en bêta-carotène sur le métabolisme des caroténoïdes et la couleur du filet chez le poulet. In : 9. Journées de la Recherche Avicole. Synthèses et textes résumés. 9. Journées de la Recherche Avicole ; Tours (FRA) ; 2011/03/29-30, 233 (texte intégral de 5p. sur CD-Rom p 659-662); ITAVI.

Annexe 4 – Baéza, E; Arnould, C; **Jlali, M**; Chartrin, P; Gigaud, V; Mercierand, F; Durand, C; Méteau, K; Le Bihan-Duval, E; Berri, C. ; 2012. Influence of increasing slaughter age of chickens on meat quality, welfare and technical and economic results. Journal of Animal Science 2011 Dec 28. [Epub ahead of print]

Introduction

En France, les viandes de volailles représentent l'une des principales viandes consommées, occupant même la première place des viandes produites, avec près de 35 % du volume total. Sur le plan nutritionnel, ces viandes sont importantes puisqu'elles permettent un apport protéique conséquent pour une teneur faible en matières grasses. A l'instar du porc, on assiste depuis quelques années à une forte progression de la consommation de produits de découpes ou élaborés (charcuteries crues, jambons, nuggets, etc.) au détriment des volailles consommées en carcasses entières. Ceci pose la question de l'adaptation de la viande à ces nouvelles formes d'utilisation et renforce l'importance de la qualité technologique. Celle-ci se définit comme l'aptitude de la viande à être conservée crue ou transformée, et fait intervenir de nombreux paramètres tels que le pouvoir de rétention d'eau, la couleur ou encore la texture. Ces éléments vont aussi largement influencer les propriétés sensorielles de la viande et son acceptabilité par les consommateurs.

Parmi les éléments déterminants de la qualité des viandes de volailles, la cinétique de chute de pH qui intervient *post-mortem* dans le muscle constitue un élément majeur. En effet, les viandes dont le pH chute rapidement et/ou dont le pH ultime est bas présentent en plus d'une couleur extrêmement pâle un pouvoir de rétention en eau médiocre qui les rend peu adaptées à la transformation. On parle alors de viandes PSE (Pale, Soft, Exsudative) ou de viandes acides, identifiées depuis longtemps chez le porc mais plus récemment chez la dinde et le poulet. A l'inverse, les viandes qui ont un pH ultime élevé présentent un fort pouvoir de rétention d'eau qui leur confère une bonne aptitude à la transformation mais en revanche une capacité de conservation en cru limitée en raison d'un risque de développement microbien accéléré. Par ailleurs, les récentes enquêtes menées dans des abattoirs français indiquent que les variations de pH de la viande génèrent des variations importantes de couleur et de texture qui sont très préjudiciables pour les professionnels de la découpe.

Chez le poulet, il est maintenant bien établi que l'évolution du pH après la mort de l'animal est fortement liée à la teneur en glycogène du muscle au moment de l'abattage. Celle-ci détermine en grande partie le pH ultime de la viande et par voie de conséquence l'ensemble des propriétés physico-chimiques qui en dépendent. Même si les mécanismes précis qui contrôlent la teneur en glycogène du muscle restent encore à élucider, il a été montré que des facteurs tels que la génétique, la nutrition mais aussi l'âge, le sexe et les conditions qui précèdent l'abattage des animaux sont impliqués.

Si la maîtrise du pH *post-mortem* apparaît cruciale pour garantir la qualité technologique et sensorielle des viandes de volaille, elle n'exclut pas l'intervention d'autres paramètres qui vont en particulier influencer la composition chimique des produits et donc leur valeur nutritionnelle mais aussi leur apparence. Ainsi, la couleur de la viande, en particulier sa composante jaune, est en grande partie influencée par la teneur en pigments caroténoïdes apportés par l'alimentation. La teneur en pigments caroténoïdes et de ce fait très dépendante du type de matière première ingéré par l'animal mais aussi de la génétique puisqu'il a récemment été mis en évidence l'existence de deux variants génétiques de poulet plus ou moins aptes à stocker les caroténoïdes dans leurs muscles. La couleur de la viande est d'une façon générale un facteur de qualité important puisqu'il va influencer la perception du consommateur jouant ainsi un rôle décisif au moment de l'achat. Concernant la couleur jaune en particulier, son appréciation est d'autant plus importante qu'elle répond à des attentes particulières correspondant à des préférences variables selon les cultures ou les zones géographiques considérées.

Depuis quelques années, l'Unité de Recherches Avicoles de l'INRA de Tours développe une thématique dont l'objectif est de comprendre les mécanismes physiologiques impliqués dans les variations de qualité de la viande chez le poulet en lien notamment avec la génétique et la nutrition. Grâce à des études de génomiques fonctionnelles et positionnelles, plusieurs gènes et/ou voies métaboliques ont été identifiés comme jouant un rôle important dans le déterminisme de la qualité des viandes. L'objectif est maintenant de mieux comprendre leur régulation par les facteurs de production.

L'objectif de ma thèse s'inscrit dans cette dynamique et a pour objectif d'approfondir les études des mécanismes moléculaires contrôlant la qualité de la viande de volaille, notamment en étudiant leur régulation par des facteurs génétiques et alimentaires et en considérant leurs interactions. La première partie de la thèse a été consacrée à l'étude du métabolisme du glycogène musculaire en lien avec les variations de pH et de qualité technologique de la viande. La seconde s'est focalisée sur l'exploration des mécanismes qui contrôlent les teneurs en caroténoïdes du muscle en lien avec la coloration de la viande.

Dans une première partie bibliographique, je donnerai quelques éléments de contexte sur la production de volaille de chair puis je présenterai quelques aspects de la biologie du muscle squelettique essentiels à la compréhension des mécanismes qui interviennent lors de la transformation du muscle en viande et la mise en place des caractéristiques finales de qualité des viandes. J'aborderai ensuite plus précisément les mécanismes moléculaires impliqués dans le métabolisme du glycogène musculaire d'une part et celui des caroténoïdes d'autre part. Dans les deux cas, je présenterai les principaux acteurs impliqués, leurs modes de régulation et les conséquences en termes de métabolisme et de qualité des viandes. La présentation et la discussion des résultats expérimentaux s'articuleront autour de 3 articles : le premier sur la régulation du glycogène musculaire et les deux suivants sur la régulation des caroténoïdes en lien avec les facteurs génétiques et nutritionnels. L'ensemble des éléments issus de nos études expérimentales sera enfin discuté dans le cadre d'une conclusion générale qui évoquera par ailleurs les implications possibles pour la production avicole et les perspectives d'études à envisager pour approfondir l'exploration des mécanismes physiologiques mis à jour au cours de la thèse.

Etude bibliographique

Tableau 1 : Principales productions mondiales de viande de volailles (en millions de tonnes équivalent carcasse) (ITAVI d'après FAO, 2010).

	Production	Evolution 2010/2009
Etats-Unis	19,3	+1,8 %
Chine	16,3	+3,7 %
Brésil	12,6	+9,5 %
UE à 27	11,9	+2,3 %
Monde	95,7	+2,2 %

Tableau 2 : Principales productions de viande de volailles dans l'Union Européenne à 27 (en milliers de tonnes équivalent carcasse) (ITAVI, 2011).

Pays	Production	Evolution 2010/2009 (%)	EMA 2000-2010 (%)
France	1817,1	+ 1,8	- 2,0
Royaume Uni	1568,0	+ 8,0	+ 0,3
Allemagne	1553,0	+ 11,2	+ 5,4
Espagne	1269,8	- 3,2	+ 1,2
Pologne	1297,0	=	+ 8,3
Italie	1157,0	+ 2,1	+ 0,7
Pays-Bas	727,0	=	+0,5
Hongrie	368,0	- 3,9	- 1,7
Portugal	335,0	+ 1,5	+ 1,4
Total UE à 27	11975	+ 2,4	+ 1,4

Partie A. LA PRODUCTION DE VOLAILLES DE CHAIR

I. Evolution de la production de viande de volailles

La production mondiale de viande de volailles en 2010 est estimée à environ 96 millions de tonnes (Tableau 1). Elle se situe au second rang derrière la viande de porc (108 millions de tonnes) et devant la viande bovine (65 millions de tonnes). Les premiers producteurs mondiaux de viande de volailles sont les Etats-Unis (20 %), la chine (17 %), le Brésil (13 %) et l'Union Européenne (12 %). Selon la FAO, la croissance de la production de volailles devrait se poursuivre en 2011 en raison des prix élevés des viandes concurrentes. Cependant, l'augmentation permanente des prix des matières premières pourrait atténuer cette tendance.

En 2010, la production de volailles de l'UE à 27 est environ de 12 millions de tonnes. Elle est en progression de 2,4 % par rapport à 2009, probablement en raison des hausses observées dans les principaux pays producteurs (Allemagne, Royaume Uni) et du retour de la croissance de la production française (+1,8 % toutes volailles, +3,4 % poulet). La production est toutefois très variable selon les pays (Tableau 2). La France reste le premier producteur européen de viandes de volailles avec 1,8 millions de tonnes en 2010 représentant ainsi 15,2 % de la production totale européenne au lieu de 20 % en 2001. La France est aussi le premier exportateur européen de produits avicoles. L'Allemagne et le Royaume Uni produisent chacun environ 13 % des viandes de volailles européennes, avec des croissances (11,2 % et 8 %, respectivement) toutefois beaucoup plus dynamiques que celle de la France.

En France, la consommation de viande de volailles a augmenté considérablement depuis 40 ans passant de 16 % à 28 % de la consommation totale de la viande. Elle est de 24,2 kg par habitant et par an en 2009 contre seulement 12,2 kg en 1970 (France AgriMer, 2010). Cette viande occupe le deuxième rang après celle de porc et avant celles des bovins et des ovins. Ces évolutions de consommation de viande entre espèces sont dues d'une part aux prix relatifs des viandes les unes par rapport aux autres et à la modification de l'offre disponible des produits carnés d'autre part.

Tableau 3 : Evolution de la production française de volailles par espèce (en milliers de tonnes équivalent carcasse) (ITAVI d'après SSP, 2011).

Espèce	2000	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Poulet	1084,4	1014,4	886,2	999,7	1013,87	1008,0	1042,0
Dinde	763,2	564,2	512,2	469,2	455,7	423,7	409,7
Canard	234,1	260,5	261,5	272,2	264,6	235,9	240,1
Pintade	60,2	50,1	45,1	45,9	44,9	41,5	39,6
Volailles	2223,5	1974,7	1785,5	1868,0	1857,0	1784,2	1817,1

II. Segmentation du marché français

II.1. Diversité des espèces avicoles

La production de viande de volailles se caractérise par une large gamme de produits originaires de plusieurs espèces essentiellement le poulet, la dinde, la pintade et le canard (Tableau 3). Le poulet est l'espèce aviaire la plus produite en France représentant en 2010 plus que 57 % de la production française totale de volailles de chair. La dinde et le canard comptent pour 22,5 % et 13,2 % de cette production, respectivement. La pintade occupe une faible place avec uniquement 2,2 % de la production totale de volailles de chair. Il existe d'autres espèces avicoles productrices de viande comme les pigeons, les cailles et les gibiers mais leurs productions restent minimales au regard des autres.

II.2. Diversité des modes de production avicole

Dans le système avicole français, il existe plusieurs types de production qui diffèrent par leur mode d'élevage, plus ou moins extensif, et le type de souche utilisé (à croissance plus ou moins rapide). Concernant le poulet, il existe 6 types de production principaux :

- La production de poulets standards consiste à utiliser une souche à croissance rapide permettant un abattage des poulets à un âge précoce allant de 35 à 42 jours avec un poids moyen généralement compris entre 1,6 à 2,1 kg. Elle représente le type le plus répandu dans la production des volailles en France.
- En marge de la production standard se développe une production de poulets lourds ou extra-lourds, issus des souches standards mais abattus à un âge plus avancé, entre 43 et 67 jours. Le poids vif à l'abattage varie entre 2,1 et 2,8 kg pour les poulets lourds et dépasse souvent les 3 kg pour les extra-lourds.
- Il existe une production de poulets « exports » à destination des pays du Moyen-Orient mais aussi de l'Europe. Dans ce cas, des souches standards sont aussi utilisées mais leur durée de l'élevage n'excède pas 38 jours avec un objectif de poids moyen à l'abattage compris entre 1 et 1,6 kg.

- Le Label Rouge a été créé en 1965 pour attester de la qualité supérieure de certains produits par rapport au standard (Sauveur, 1997). Les poulets Label Rouge sont issus de souches réputées pour leur rusticité et leur croissance lente permettant un abattage à un âge minimal de 81 jours, c'est-à-dire environ deux fois plus tardif que celui des animaux standards. Ces poulets sont élevés en plein air sur des parcours herbeux et nourris avec 75 % au minimum de céréales. La taille des élevages des poulets Label est aussi limitée à quatre bâtiments de 400 m² par éleveur.
- Les poulets certifiés sont le plus souvent issus de croisements entre un coq lourd et une femelle à croissance lente (type Label). Le cahier des charges impose à ce mode d'élevage des conditions d'élevage (alimentation, logement, densité, ...) spécifiques mais n'impose pas l'accès au plein air. Il assure aux consommateurs un suivi minutieux du parcours de la volaille et donc une sécurité alimentaire optimale. L'alimentation doit contenir un pourcentage minimum de céréales, distribuées pendant au moins 51 % de la durée de l'élevage. Les animaux sont abattus au minimum à 56 jours d'âge et leurs poids sont généralement compris entre 1,8 et 2,3 kg. Les produits de volailles certifiées sont identifiés par une annotation CQC (Critère Qualité Certifié). La production de ce type de volailles manque cependant de lisibilité au niveau des consommateurs ce qui a limité son développement.
- La filière avicole biologique est apparue dans les années 1970. Dans un premier temps régie par des cahiers des charges privés, elle obéit depuis 1999 au règlement CEE 804/99 (Règlement européen pour les productions animales biologiques, Repab) qui impose un âge minimal à l'abattage de 81 jours et une alimentation biologique à 90 % contenant des céréales (maïs, blé, avoine, sarrasin, et triticales) issues uniquement de l'exploitation. Le nombre des animaux est limité à 500 par bâtiment avec un accès libre à un parcours extérieur.

II.3. Diversité des produits issus de la production avicole de chair

La production de viande de volailles française se caractérise par une forte segmentation. Elle s'explique à la fois par le grand nombre d'espèces avicoles produites (poulet, dinde, pintade,

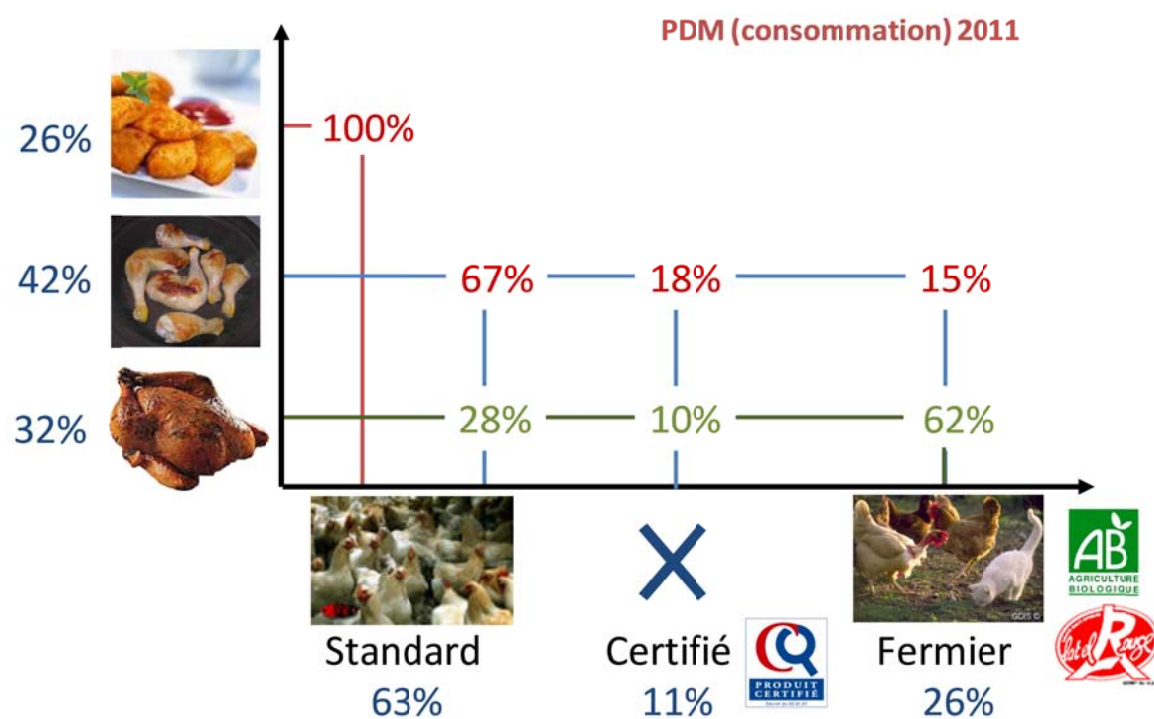


Figure 1. Consommation par type de production et type de produit (Données ITAVI, 2011).

canard, etc.) mais aussi par la diversité des modes de production qui contribue à proposer aux consommateurs une gamme de produits aux qualités gustatives bien différenciées (poulet fermier Label Rouge vs poulets standard par exemple). En 2011, la consommation de poulets standards représentait environ 63%, celle de poulets certifiés 11%, les poulets Label Rouge et Bio comptant respectivement pour 22 et 4% de la consommation française.

A l'instar des autres pays occidentaux, la production française propose également une large gamme de produits qui vont de la volaille vendue entière, aux découpes et aux produits élaborés. Ces derniers sont de plus en plus nombreux (saucisses, jambons, nuggets, wings, viandes marinées, etc.) et voient leur part de marché régulièrement augmenter. En effet, l'évolution des modes de vie occidentaux favorisent la consommation de plats rapides et faciles à préparer et de ce fait la consommation de découpes et d'élaborés au détriment des volailles entières. Ces dernières représentent actuellement environ 32 % des achats de viande de poulets contre 42 % et 26 % pour les produits de découpes et élaborés, respectivement. A titre de comparaison, la consommation de poulets entiers représentait 52% en 1998, celle de découpes 33% et de produits élaborés 15%. L'approvisionnement diffère cependant entre filières de commercialisation (Figure 1). Ainsi, près de 60% des poulets consommés entiers proviennent des filières productions extensives de type Label Rouge ou Bio, alors que les produits élaborés sont exclusivement fabriqués à partir de matière première standard. Plus de 70% des produits de découpe proviennent de la production standards, les autres 30% se répartissant entre les filières certifiés, Label Rouge et Bio.

II.4. Maîtrise de la qualité des produits

Dans un contexte où la production des découpes et des élaborés devient majoritaire par rapport à la vente en carcasse entière, la maîtrise de l'aptitude à la transformation et à la conservation des viandes est devenue un enjeu majeur de compétitivité pour les filières de volailles de chair. En effet, les enquêtes terrain réalisées par l'ITAVI et l'INRA entre 2008 et 2010 montrent qu'il existe une forte hétérogénéité de la qualité des viandes qui s'observe au niveau de la couleur, de la texture et des rendements technologiques (Gigaud et al., 2009, 2011 ; Berri et al., 2010). L'origine des variations de qualité est multifactorielle et de ce fait difficile à maîtriser (Berri et al., 2000 ; Gigaud et al., 2009). Elle implique à la fois des facteurs liés à l'animal et son mode de production (génétique, alimentation, durée d'élevage

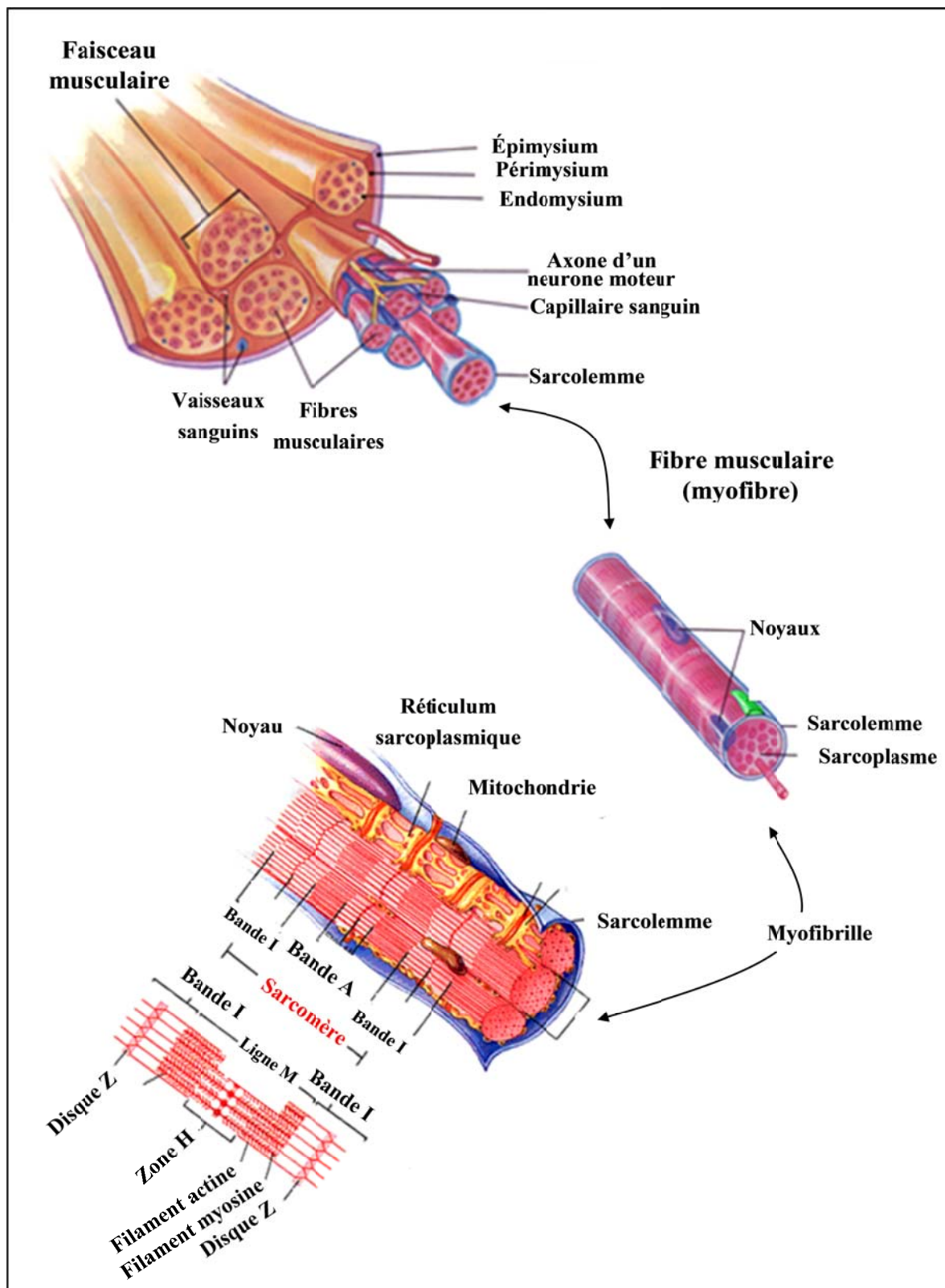


Figure 2. Anatomie du muscle squelettique au niveau macroscopique et microscopique (d'après Tortora et al., 1994).

par exemple) mais aussi des facteurs d'environnement liés à l'abattage des animaux (conditions de transport, d'attente à l'abattoir, etc.) et de traitements des carcasses (cinétique de réfrigération, délai entre abattage et découpe, etc.).

Si la maîtrise des facteurs entourant l'abattage des animaux et le traitement des carcasses sont incontournables pour réduire l'hétérogénéité de la qualité des viandes, la maîtrise en amont de la qualité apparaît essentielle pour améliorer durablement la qualité de la production. En effet, les caractéristiques de la viande se construisent avant tout *in vivo* sous le contrôle de facteurs à la fois génétiques et de production. En effet, les transformations physico-chimiques du muscle qui interviennent après la mort de l'animal et qui sont déterminantes pour la qualité finale du produit dépendent en grande partie des caractéristiques biologiques du muscle et de la physiologie générale de l'animal. Le paragraphe suivant se propose de décrire les principales caractéristiques musculaires qui interviennent lors des processus de transformation du muscle en viande. Ces derniers seront décrits ainsi que leurs conséquences sur les principaux paramètres qui influencent la qualité technologique de la viande chez les volailles.

Partie B. MUSCLE SQUELETTIQUE ET SA TRANSFORMATION EN VIANDE

I. Muscle squelettique

I.1. Généralités sur la structure du muscle squelettique

Le muscle squelettique (ou strié) est un tissu très hétérogène qui recouvre le squelette osseux et s'y attache *via* les tendons. Il est constitué de faisceaux et de fibres entourés d'une trame de tissu conjonctif (Figure 2). C'est un organe complexe qui contient des milliers de fibres musculaires, des vaisseaux sanguins, des neurofibres et du tissu conjonctif.

L'ensemble du muscle squelettique est recouvert d'une gaine de tissu conjonctif appelée l'épimysium, qui constitue l'enveloppe conjonctive externe du muscle. À l'intérieur de cette couche, les fibres musculaires sont réunies en faisceaux qui sont eux délimités par le périmysium. Cette enveloppe de tissu conjonctif contient des vaisseaux sanguins nécessaires

à l'irrigation du muscle, qui se prolongent en capillaires pour atteindre toutes les composantes internes du muscle. Les vaisseaux sanguins apportent au tissu musculaire les nutriments et l'oxygène nécessaire à son fonctionnement et permettent aux muscles de se débarrasser de leurs produits indésirables. À l'intérieur de chaque faisceau, chacune des fibres musculaires est entourée par une autre couche mince de la matrice extracellulaire appelée endomysium (Geay et al., 2002). Elles sont aussi entourées d'une membrane plasmique, le sarcolemme, qui abrite le sarcoplasme contenant de nombreux noyaux, des mitochondries, le réticulum sarcoplasmique ainsi que d'autres organites plus au moins spécialisés et des molécules de glycogène permettant le stockage du glucose.

La fibre musculaire contient des milliers de longues structures complexes composées de groupes de filaments appelés myofibrilles. Ces dernières constituent l'élément contractile du muscle et sont composées de plusieurs unités contractiles appelées les sarcomères (Swartz et al., 1993). Les sarcomères sont délimitées par les stries Z (Rahelić et al., 1985). Ils sont principalement composés de filaments fins (actine associée à la tropomyosine et la troponine) et de filaments épais essentiellement constitués de myosine (Swartz et al., 1993 ; Choi et Kim, 2009).

- Les filaments d'actine sont les composantes principales des bandes I (filaments fins) et s'étendent jusqu'aux bandes A. Ils sont reliés à la titine dans le disque Z *via* la protéine α -actinine. La titine constitue la plus grosse protéine à l'état naturel, elle joue un rôle structural majeur dans l'assemblage et le maintien de la structure du sarcomère.
- Les filaments de myosine (filaments épais) sont localisés au milieu du sarcomère au niveau de la bande A et se superposent dans la ligne M (centre du sarcomère). Ils sont liés à ce niveau à la titine *via* notamment la myomésine qui par ailleurs les relie entre eux et les maintient groupés en faisceaux.

En résumé, les fibres musculaires sont de longues cellules multi-nucléées, elles renferment des protéines contractiles mais aussi des enzymes indispensables pour l'utilisation et le stockage de l'énergie (glucides, lipides) ainsi que des enzymes protéolytiques, en particulier celles responsables de la dégradation des protéines au cours de la maturation de la viande (Geay et al., 2002).

I.2. Typologie des fibres musculaires

Le muscle squelettique est composé par différents types de fibres musculaires occupant 75 à 90 % du volume du muscle (Lee et al., 2010). Ces fibres diffèrent par leurs propriétés moléculaires, métaboliques, structurelles et contractiles (Schiaffino et Reggiani, 1994, 1996; Bottinelli et Reggiani, 2000 ; Bassel-Duby et Olson, 2006 ; Choi et Kim, 2009 ; Lefaucœur, 2010). Les caractéristiques morphologiques et biochimiques des fibres musculaires constituent les principaux facteurs qui influencent le métabolisme énergétique musculaire pendant les périodes *ante-* et *post-mortem* (conversion du muscle en viande) (Ryu et Kim, 2005, 2006).

Diverses méthodes de coloration histochimiques ont été utilisées afin de décrire les caractéristiques complexes du muscle et d'identifier les différents types de fibres musculaires (Ozawa et al., 2000 ; Morita et al., 2000). Ainsi, le typage des fibres musculaires est basé sur l'utilisation d'un certain nombre d'enzymes impliquées dans le métabolisme oxydatif comme la succinate déshydrogénase (SDH) ou bien glycolytique telle que la nicotinamide adénine dinucléotide tétrazolium réductase (NADH-TR) (Baker et Santer, 1990 ; Hebling et al., 2009). Pour classer les fibres musculaires en fonction de leur vitesse de contraction, Brooke et Kaiser (1970) ont utilisé l'activité ATPasique des fibres, qui hydrolyse l'ATP pour la fourniture de l'énergie nécessaire à la contraction musculaire. Barnard et al. (1982) ont combiné la mesure de l'activité ATPasique myofibrillaire à celles des enzymes oxydatives et/ou glycolytiques afin d'établir une classification basée sur les caractéristiques contractiles (vitesse de contraction lente ou rapide) et métaboliques (métabolisme oxydatif, oxydo-glycolytique ou glycolytique).

Plus récemment, le développement de nouvelles techniques basées sur l'utilisation d'anticorps spécifiques par immunohistochimie (anticorps mono ou polyclonaux) ou l'étude des messagers par hybridation *in situ* de différents types de chaînes lourdes de myosine ont permis de procéder à une classification plus fine des fibres musculaires. Ainsi par ces approches, des fibres de types I, IIA, IIX et IIB ont été mises en évidence chez les mammifères (Smerdu et al., 1994 ; Ennion et al., 1995 ; Bottinelli et Reggiani, 2000 ; Picard et al., 2003).

Tableau 4 : Caractéristiques des différents types de fibres musculaires (Bacou et Vigneron, 1976 ; von Lengerken et al., 2002).

Type de fibres			
Nomenclature			
Brooke & Kaiser, 1970	I	IIA	IIB
Ashmore & Doerr, 1971	βR	αR	αW
Peter et al., 1972	SO	FOG	FG
Physiologie			
Contraction	Lente	Rapide	Rapide
Résistance à la fatigue	+++	++	+
Morphologie			
Couleur	Rouge	Rouge	Blanche
Myoglobine	+++	+++	+
Densité capillaire	+++	++	+
Nombre de mitochondries	+++	+++	+
Épaisseur de la strie Z	+++	++	+
Richesse en collagène	+++	++	++
Aire de section	+	+++	+++
Métabolisme énergétique			
Teneur en glycogène	+	+++	+++
Teneur en lipides	+++	+++	+
ATPase myofibrillaire	+	+++	+++
Enzymes glycolytiques	+	++	+++
Enzymes mitochondriales	+++	++	+
SO (Slow Oxidative) ; FOG (Fast Oxydo-Glycolytic) ; FG (Fast Glycolytic)			

Tableau 5 : Nomenclatures des types de fibres musculaires chez les oiseaux (Berri et Duclos, 2003).

Type selon Ashmore & Doerr (1971)	α w	α r'	β r	β '	α
Type selon Barnard et al. (1982)	IIB	IIA	I	IIIb	IIIa
ATPase (pH acide)	-	-	+	+	+/-
ATPase (pH basique)	+	+	-	+	+/-
Succinate déshydrogénase (SDH)	+	++	++	++	++

Néanmoins, quelle que soit la méthode d'analyse utilisée, il existe trois principaux types de fibres musculaires (Tableaux 4 et 5) communs aux animaux d'intérêt agronomique (bovin, ovin, porc et volaille) :

- les fibres I lentes oxydatives,
- les fibres IIA rapides oxydo-glycolytiques,
- les fibres IIB rapides glycolytiques.

Les fibres de type I (STO : Slow Twitch Oxidative, SO, β R ou I) sont des fibres rouges, à contraction lente (Picard et al., 2003). Elles sont habituellement petites et possèdent une activité contractile de la myosine lente. Ces fibres sont riches en mitochondries et en capillaires sanguins entourant chacune des fibres musculaires. Elles possèdent un métabolisme oxydatif avec une forte résistance à la fatigue (Bassel-Duby et Olson, 2006). Ce type de fibres musculaires est caractérisé par la présence de fortes activités des enzymes impliquées dans la voie de synthèse aérobie de l'ATP (Lefaucheur, 2010).

Les fibres de type IIB (FTG : Fast Twitch Glycolytic, FG, α W ou IIB) sont des fibres blanches à contraction rapide. Elles sont généralement grosses, peu vascularisées, riches en enzymes de la glycolyse, pauvres en myoglobine et en mitochondries (Berri et Duclos, 2003 ; Lefaucheur, 2003 ; Choi et al., 2010 ; Lefaucheur, 2010). Bien que ces fibres de type IIB possèdent des réserves en glycogène plutôt élevées, la dégradation rapide de celui-ci et l'accumulation importante d'acide lactique dans ce type de fibres leur confèrent une faible résistance à la fatigue.

Les fibres musculaires de type IIA (FTOG : Fast Twitch Oxido-Glycolytic, FOG, α R ou IIA) ont des caractéristiques métaboliques et structurales intermédiaires entre les fibres de type I et celles de type IIB ainsi qu'une couleur rouge (Jurie et al., 1999).

Selon Barnard et al. (1982), il existe deux classes additionnelles spécifiques aux muscles aviaires, les fibres lentes toniques multi-innervées de types IIIa et IIIb, qui ne sont pas retrouvées dans les muscles squelettiques des mammifères.

Les proportions et les caractéristiques biochimiques de ces fibres musculaires, en particulier leur teneur en glycogène influencent la conversion du muscle en viande et les critères ultimes

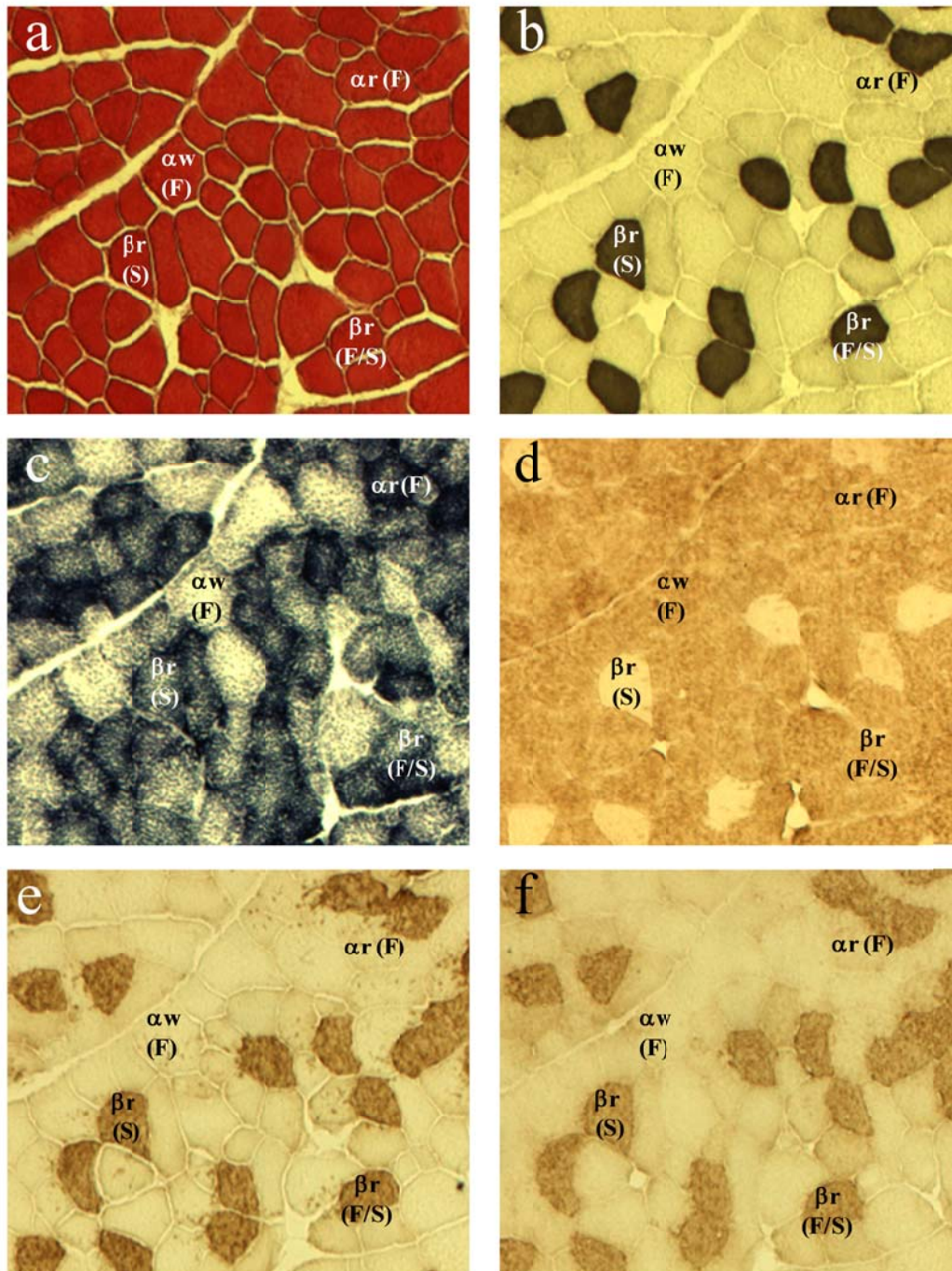


Figure 3. Caractérisation des fibres musculaires sur coupes sériées de muscle *Sartorius* (partie mixte) de poulet (d'après Berri & Duclos, 2003).

a : azorubine; b : activité ATPasique à pH acide; c : activité succinate déshydrogénase (SDH); d : anticorps F59 (MyHC rapide); e : anticorps S58 (MyHC lentes 2 et 3); f : anticorps S21 (MyHC lente 1).

Tableau 6 : Variation de la composition chimique des viandes entre certaines espèces (Favier et al., 1995 ; Rabot, 1998).

Ingrédients (/100g)	Poulet		Dinde		Agneau	Veau	Bœuf
	Filet	Cuisse	Filet	Cuisse	Cuisse	Gigot	Flanc
Eau (g)	74,7	74,2	74,2	75,7	65	75	66,4
Protéines (g)	22,3	18,4	23,4	20,4	18	20,4	19,6
Lipides (g)	1,3	4,5	1,3	2,9	16	3	13
Cholestérol (mg)	50	91	55	78	74	80	65
Fer (mg)	1		0,7	1,8	2,6	0,8	2,5
Niacine (mg)	7,7		7,9	3,9	5,4	8,6	4,1
Vitamine E (mg)	0,22		traces	traces	0,15	0,15	0,3
Vitamine B6 (mg)	0,45		0,58	0,34	0,25	0,54	0,3
Vitamine B12 (µg)	0,4		0,73	1,7	2	1,2	2
Folate (µg)	10		8	20	4	14	9
Sodium (mg)	76		63	71	70	92	70

de la qualité des viandes (Choe et al., 2008 ; Le Bihan-Duval et al., 2008 ; Sibut et al., 2008 ; Choi et Kim, 2009). Chez le porc, les pourcentages des différents types de fibres du muscle *Longissimus dorsi* sont 13 % de STO, 17 % de FTOG et 70 % de FTG. Chez les volailles, le muscle P. major du filet est formé quasi exclusivement de FTG (Lengerken et al., 2002), alors que les muscles de la cuisse contiennent plusieurs types de fibres. A titre d'exemples, le muscle *Biceps femoris* est formé de 12 % de STO, 0,5 % de FTOG et 87,5 % de FTG (Papinaho et al., 1996), la partie mixte du muscle *Sartorius* de 21 % de STO, 29 % de FTOG et 50 % de FTG alors que la partie rapide de ce même muscle contient 15% de FTOG et de 85% de FTG (Rémignon et al., 1996). La Figure 3 représente un exemple de caractérisation par méthodes enzymologiques et immunohistochimiques de fibres musculaires dans la partie mixte du muscle *Sartorius* de poulet (Berri et Duclos, 2003).

I.3. Composition chimique

Le muscle squelettique est constitué dans des proportions variables d'environ 75 % d'eau, 20 % protéines, 5 % de lipides, 1 % de glucides et 1 % de minéraux et de vitamines (Huff-Lonergan et Lonergan, 2005). Cette composition chimique est toutefois influencée par des facteurs intrinsèques tels que l'espèce animale, la race ou la lignée, l'âge et le type de muscle, et par des facteurs extrinsèques, en particulier l'alimentation (Pinchasov et al., 1989 ; Olomu et Baracos, 1991 ; Wattanachant et al., 2004). Par rapport aux autres espèces d'intérêt agronomique, la volaille (poulet, dinde) présentent des muscles plutôt riches en protéines et pauvres en lipides, notamment au niveau du filet (Culioli et al., 2003 ; Tableau 6).

La majeure partie de l'eau du muscle est maintenue dans la structure et les cellules musculaires. Elle existe sous trois formes : liée, immobilisée ou libre (Offer et Knight, 1988 ; Huff-Lonergan et Lonergan, 2005 ; Pearce et al., 2011).

En fonction de leur solubilité et de leur localisation dans le tissu musculaire, les protéines musculaires se répartissent en protéines sarcoplasmiques, myofibrillaires ou encore en protéines du stroma (Lee et al., 2010).

Les protéines sarcoplasmiques représentent environ 25 % des protéines musculaires. Elles sont solubles dans l'eau ou dans un tampon de faible force ionique. Parmi elles, il existe un

Tableau 7 : Différents types de protéines musculaires (D'après Berri, 1995 ; Molette, 2004)

Protéines	Poids moléculaire (kDa)	% des protéines myofibrillaires	Localisation dans le sarcomère
Protéines myofibrillaires			
• Protéines contractiles			
Myosine	500	43	Bande A, filament épais
Actine	42	22	Filament fin
• Protéines régulatrices			
Tropomyosine	34+36	5	Filament fin
Troponine C	18		
Troponine I	23	5	Filament fin
Troponine T	37		
• Protéines insolubles			
α-actinine	95 x 2	2	Disque Z
β-actinine	37 + 34	<1	Bande A
γ-actinine	35	<1	Filament Z
Protéines sarcoplasmiques			
Glycéraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase	143	1,2	Sarcoplasme
Aldolase	157	0,6	
Créatine kinase	86	0,5	
Enolase	82	0,5	
Lactate dshydrogénase	146	0,4	
Pyruvate kinase	231	0,3	
Phosphorylase	194	0,25	
Triosephosphate isomérase	53	0,2	
Phosphoglycéromutase	58	0,1	
Phosphoglucose isomérase	132	0,1	
Phosphofructokinase	320	0,1	
Myoglobine*	17	6	
Protéines du stroma			
Collagène	300		
Elastine	68		

ensemble d'enzymes glycolytiques (environ 70 % des protéines sarcoplasmiques) localisées à proximité de l'actine permettant une meilleure efficacité des réactions enzymatiques impliquées dans la glycolyse (Lawrie, 1998). Il existe aussi d'autres protéines comme les hydrolases, notamment les protéinases qui jouent un rôle important au cours de la maturation *post-mortem* de la viande (Bond et Warner, 2007 ; Huff-Lonergan et al., 2010), les transférases, les oxydoréductases et la myoglobine.

Les protéines myofibrillaires représentent environ 55 % des protéines musculaires (Barbut, 2002). Elles sont responsables des propriétés contractiles du muscle (Lee et al., 2010). Les myofibrilles sont formées de protéines filamenteuses (actine et myosine), de protéines de régulation (tropomyosine, troponine,...) et de protéines insolubles de la strie Z (α -actinine, desmine,...).

Les protéines du stroma représentent 10 à 15 % des protéines musculaires. Le collagène représente la protéine la plus abondante assurant l'assemblage des différents constituants du muscle squelettique. Les teneurs de ces protéines varient selon la fonction musculaire.

Une liste des principales protéines constituant le muscle est présentée dans le tableau 7.

Les lipides musculaires sont constitués de lipides membranaires (les phospholipides) et de lipides de réserve (les triglycérides). Les triglycérides sont à la fois présents à l'intérieur des fibres sous forme de gouttelettes lipidiques et à l'extérieur des fibres au niveau des cellules adipeuses intermusculaires ou adipocytes. Le plus souvent, ces lipides varient en fonction des aliments consommés et de la nature des acides gras présents dans la ration des animaux (Geay et al. 2002; Ponte et al., 2008). Les viandes de volailles sont relativement pauvres en lipides, mais elles sont considérées comme une source importante d'acides gras polyinsaturés, en particulier, de type n-3, bénéfiques pour la santé humaine (Howe et al., 2006).

Le glycogène représente une faible part de la composition du muscle. Sa concentration est en général comprise entre 80 et 120 micromoles d'équivalent lactate par g de muscle. La teneur en glycogène varie surtout en fonction des espèces animales, des types de muscles et des régimes alimentaires (McVeigh et al., 1982; Berri et al., 2005b ; Choe et al., 2008). Ce polymère de glucose qui forme un complexe de stockage des sucres dans la cellule animale,

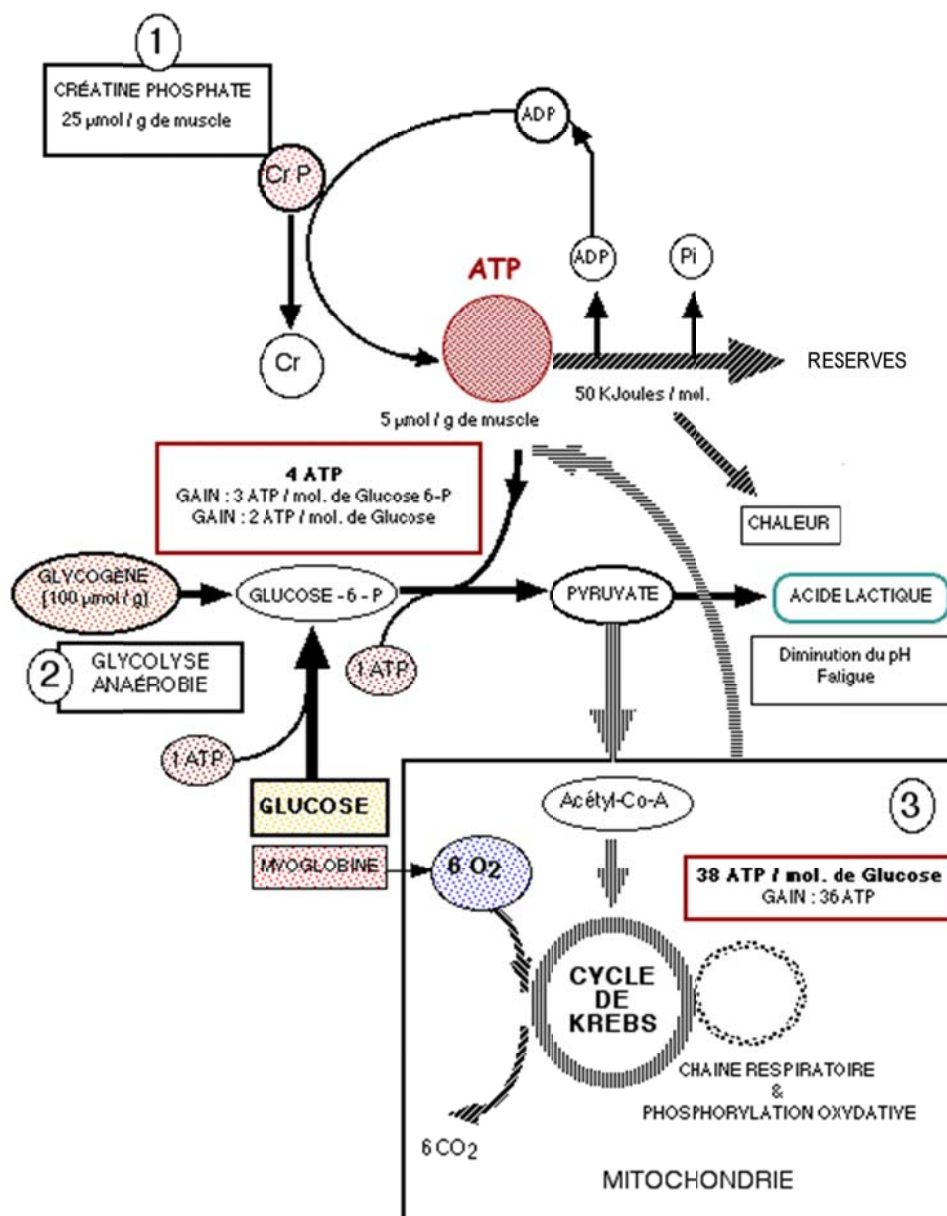


Figure 4. Métabolisme énergétique de la contraction musculaire.

est présent dans le foie et dans les muscles. Il est fortement impliqué dans les phénomènes de transformation du muscle en viande qui interviennent après la mort de l'animal.

Le sodium et le potassium sont les macroéléments les plus abondants, à l'état libre ionisé. La viande des animaux est également riche en fer héminique, mais la teneur en cet élément reste variable en fonction des espèces. A titre indicatif, elle est 3 fois plus importante dans la viande des ruminants que dans celles de porc et de poulet (Geay et al., 2002). Le calcium et le magnésium sont sous forme de complexes organiques liés aux protéines et aux composés phosphorylés. Ces cations sont activateurs ou inhibiteurs de réactions enzymatiques importantes dans la contraction musculaire.

I.4. Métabolisme musculaire

L'adénosine triphosphate (ATP) constitue la source d'énergie primordiale utilisée par la cellule musculaire (Figure 4). En effet, l'hydrolyse de l'ATP permet de fournir l'énergie qui servira à des fins mécaniques (contraction musculaire), chimiques (biosynthèse et anabolisme) ou bien osmotique (transport actif) (Scheffler et al., 2011). Le catabolisme de l'ATP est équilibré par les différentes voies métaboliques qui produisent de l'énergie sous forme d'ATP en catabolisant les métabolites énergétiques stockés surtout sous forme du glycogène et de triglycérides. Ces voies métaboliques permettent la survie des cellules musculaires en préservant leur homéostasie.

Au repos, le besoin du muscle squelettique en énergie est faible, il est assuré par la voie aérobie du métabolisme oxydatif. Cependant, quand la disponibilité en oxygène devient insuffisante sous l'effet d'une contraction musculaire importante, l'ATP est fournie au muscle *via* une voie anaérobie. La phosphocréatine (PCr), molécule riche en énergie, permet de produire l'ATP mais d'une manière temporelle jusqu'à l'activation d'autres voies métaboliques génératrices d'énergie. La réaction de conversion de l'ADP et de la PCr en ATP et créatine (Cr) est assurée par la créatine kinase. Cette voie permet la génération rapide de l'ATP mais elle n'est efficace que pour des périodes brèves. Ainsi, dans le cas d'un effort intense et prolongé, la PCr sera mobilisée en quelques secondes conduisant à une baisse rapide des concentrations musculaires en ATP. Outre la PCr, le muscle squelettique est capable de produire de l'ATP à partir de ses propres réserves de glycogène. Après la mort de

l'animal, l'acide pyruvique formé ne pénètre plus dans les mitochondries, il est converti dans le cytoplasme par la lactate déshydrogénase en acide lactique (Monin, 1988). Il s'en suit une baisse du pH musculaire et une régénération de NAD^+ favorable au fonctionnement de la glycolyse dans des conditions anaérobies (Scheffler et al., 2011). Lorsque le pH musculaire passe à des valeurs inférieures à 6, l'activité des enzymes musculaires est modifiée et l'efficacité de la contraction du muscle chez l'animal mort diminue indiquant la fin du métabolisme énergétique (Poso et Puolanne, 2005).

II. Transformation du muscle en viande : les principales modifications physico-chimiques

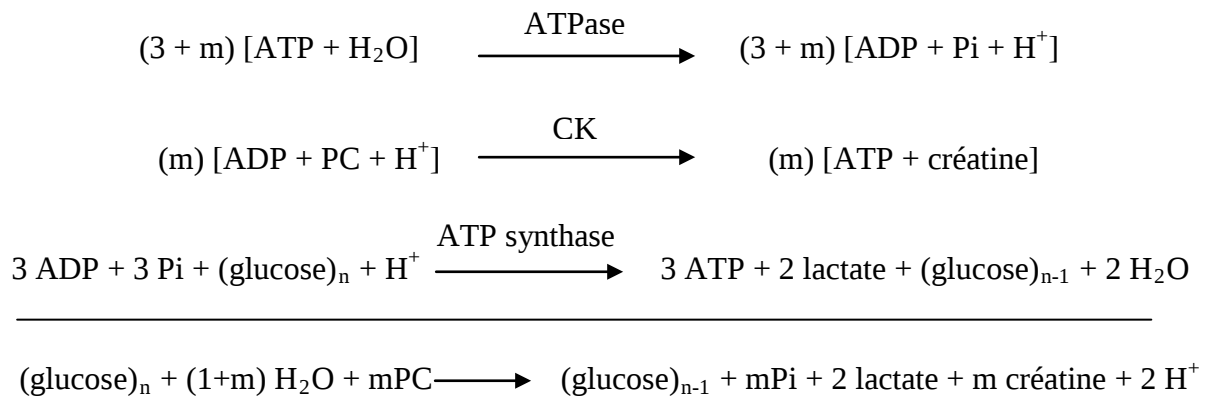
A la suite de l'abattage, le muscle squelettique est le siège d'importantes modifications chimiques et physiques qui assurent la transformation du muscle en viande. Ces modifications sont dues à l'anoxie tissulaire, à l'épuisement de l'ATP et à la suppression de substrats énergétiques externes comme le glucose et les acides aminés. Seuls persistent les réactions qui suivent des voies anaérobies, principalement la glycolyse, qui vise à régénérer de l'ATP et assurer l'homéostasie du muscle (Bendall, 1973 ; Bowker et al., 2000). Ces modifications physico-chimiques constituent une étape cruciale dans la transformation du muscle en viande modifiant plus au moins la composition et la structure du muscle (Valin, 1988 ; Morzel et al., 2006).

II.1. Réactions biochimiques et évolution du pH

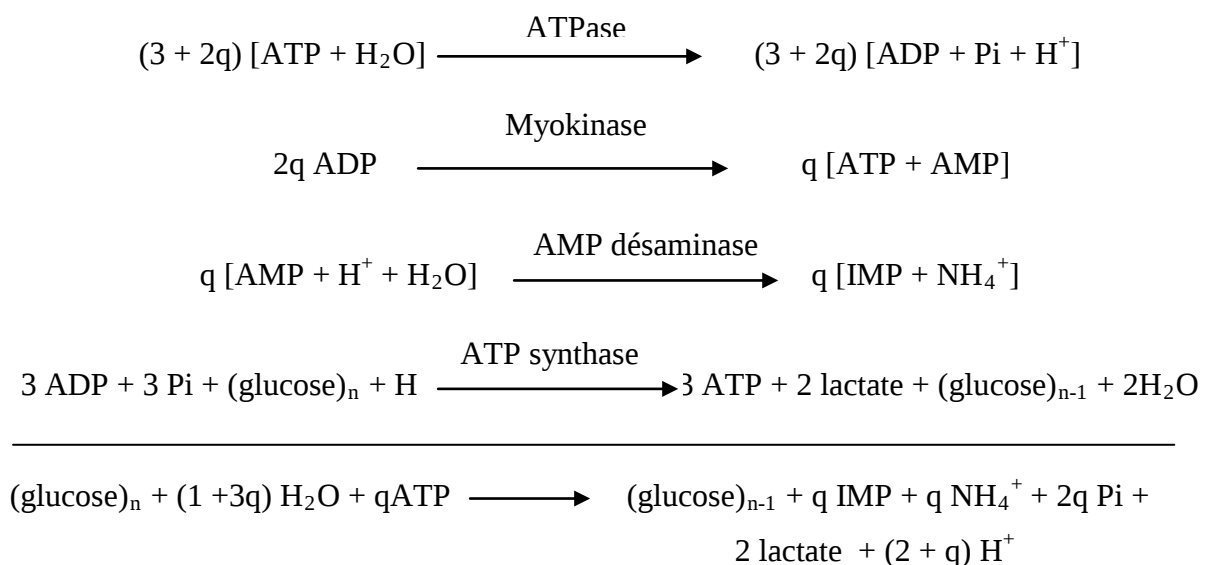
Après l'abattage, les mécanismes de conservation de l'homéostasie continue à fonctionner. Toutefois, le métabolisme musculaire est profondément modifié à cause de l'arrêt de la circulation sanguine. La disparition de la phosphocréatine (source la plus précoce de régénération de l'ATP) et du glycogène précède celle de l'ATP (Bendall, 1973 ; Bowker et al., 2000). La concentration d'acide lactique issue de la dégradation du glycogène s'élève dans le muscle parallèlement à la dégradation de l'ATP et à la libération des protons H^+ conduisant ainsi à la diminution du pH *post-mortem* (Bowker et al., 2000 ; Santé et al., 2001). L'ensemble des réactions biochimiques responsables de la dégradation et de la synthèse de l'ATP dans la cellule musculaire après la mort de l'animal ont été décrites

antérieurement par Bendall (1973). Deux phases *post-mortem* ont été décrites : une phase de latence suivie par une phase d'installation de la *rigor mortis* ou rigidité cadavérique.

La phase de latence se caractérise par un taux constant d'ATP, tandis que les concentrations en phosphocréatine et en glycogène chutent. L'ATP dégradé par les ATPases musculaires est synthétisé de nouveau suite d'une part à la dégradation de la phosphocréatine, et d'autre part, essentiellement par la glycogénolyse et la glycolyse anaérobie (McKee et Sams, 1998 ; Santé et al., 2001). Les réactions de la phase de latence se résument comme suit :



La phase d'installation de la *rigor mortis* se caractérise par la disparition de l'ATP qui s'accompagne de la désamination de l'adénosine monophosphate (AMP) et l'apparition de NH_3 (sous forme d'ion ammonium NH_4^+) en quantité stœchiométrique. L'ATP peut être régénérée dans la cellule musculaire à partir de l'ADP par l'intermédiaire de la myokinase :



Comme mentionné précédemment, les modifications biochimiques engendrées dans le muscle après l'abattage de l'animal sont accompagnées d'une formation d'acide lactique et de la libération de protons (H^+). Elles induisent ainsi la diminution du pH du muscle. L'évolution du pH *post-mortem* du muscle constitue une étape cruciale de la transformation du muscle en viande (Bowker et al., 2000 ; Poso et Puolanne, 2005).

Plusieurs études ont rapporté que la qualité des viandes de volaille, de veau, de porc, de lapin et à un moindre degré celle des viandes bovines est très dépendante des conditions d'installation de la rigidité cadavérique et principalement de la cinétique de chute du pH après la mort (Monin, 1988, 1991; Ouhayoun, 1998). Une acidification trop rapide du muscle après la mort accompagnée d'une température *post-mortem* élevée produisent chez le porc et la volaille des viandes pâles et exsudatives, qualifiée de viandes PSE (Pale, Soft, Exudative) (Rathgeber et al., 1999 ; Berri, 2000). Cette association entre une température élevée et une chute rapide du pH induit une dénaturation des protéines sarcoplasmiques, particulièrement de la créatine kinase et de la glycogène phosphorylase, associée à des pertes en eau importantes (Rathgeber et al., 1999 ; Zhu et al., 2011). Les caractéristiques de la viande sont aussi largement influencées par l'amplitude de la chute de pH, c'est-à-dire la valeur finale que le pH atteint (ou pH ultime). On distingue ainsi les viandes acides qui présentent un faible pouvoir de rétention en eau et une couleur pâle et les viandes à pH élevé qui au contraire ont une couleur sombre, une bonne capacité de rétention d'eau mais en contrepartie présentent une moins bonne aptitude à la conservation. Les viandes à pH élevé sont souvent qualifiées de viande DFD (Dark, Firm, Dry) par homologie avec les viandes rouges à coupe sombre depuis longtemps décrites chez les bovins. Chez le poulet, la viande du filet est qualifiée d'acide lorsque le pH ultime est inférieur à 5,7 et DFD quand il se stabilise à des valeurs supérieures à 6,2 (Gigaud et al., 2009).

II.2. Modifications physiques et mécaniques

Après l'abattage, le muscle perd au fur et à mesure toutes propriétés d'extensibilité et durcit. Ceci correspond à la phase d'installation de la *rigor mortis*. Lors de la phase de maturation, il s'attendrit progressivement. Au cours de ces deux phases, s'élaborent en grande partie les diverses propriétés qui conditionnent les qualités organoleptiques des viandes et en particulier la tendreté.

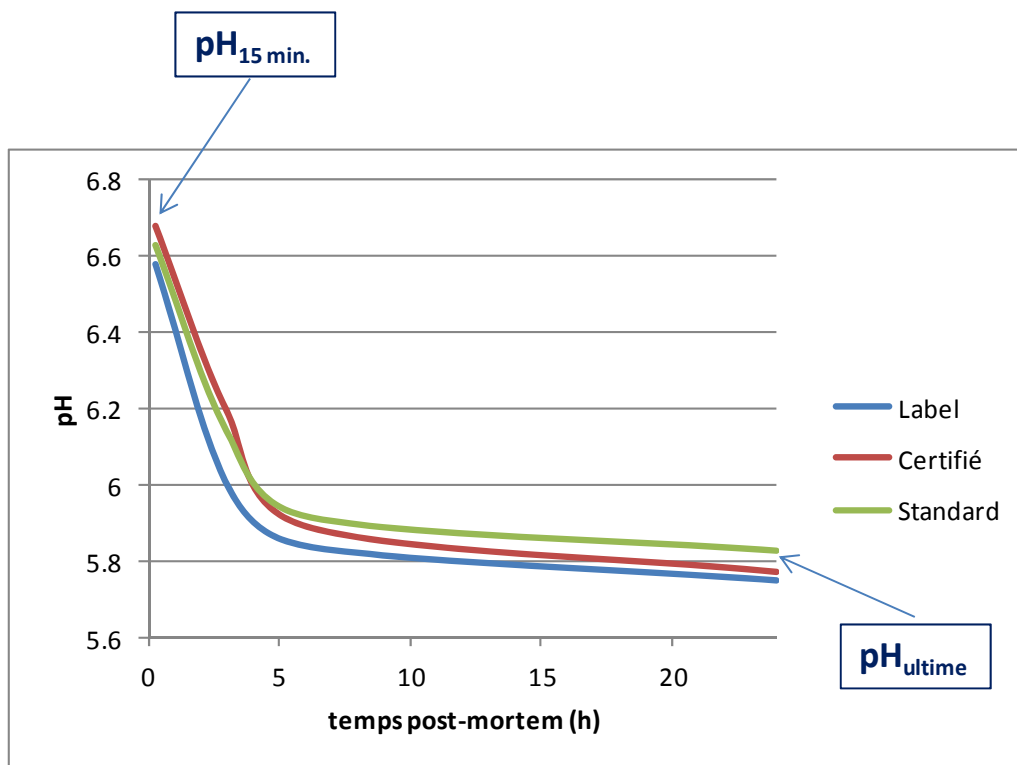


Figure 5. Cinétiques de chute de pH dans le muscle P. major de poulets issus de différents types de production : Label Rouge, certifiée, standard (d'après Gigaud et al., 2008).

Au cours de la maturation des viandes, certains éléments des fibres musculaires ou du tissu conjonctif sont dégradés par deux groupes de protéases, les protéinases neutres et les protéines lysosomiales, mais aussi par le biais de mécanismes non enzymatiques (Ouali et Talmant, 1990; Takahashi, 1996; Schreurs, 2000 ; Morzel et al., 2006). La maturation de la viande de poulet est plus rapide que celle des mammifères, principalement celle des ovins et des bovins, qui dure plusieurs semaines. Chez le poulet, la tendreté finale est atteinte en moins de 24 heures après l'abattage (Schreurs, 1997). Ceci pourrait être dû en partie à la forte activité protéolytique qui caractérise les muscles de poulet par rapport à ceux de porc, d'agneau et de lapin (Blanchard et Mantle, 1996). La maturation joue un rôle considérable dans l'élaboration de la qualité des viandes bovines, alors que son importance est moindre dans le cas des viandes porcines et quasiment négligeable pour les viandes de poulet (Bonneau et al., 1996).

III. Principaux indicateurs de la qualité technologique

III.1. Le pH *post-mortem* de la viande

Le pH est la caractéristique de la viande fraîche la plus fréquemment mesurée (Santé et al., 2001). Il constitue l'un des paramètres physiques les plus utilisés pour prédire les qualités technologiques et sensorielles de la viande (El Rammouz et al., 2004). Chez l'animal vivant, le pH du muscle chez les volailles est proche de 7,0. Après abattage, le pH diminue. Cette diminution est caractérisée comme chez les autres espèces par une vitesse et une amplitude (Figure 5). Chez le poulet, ces deux paramètres sont appréciés de la manière suivante :

- La vitesse de chute du pH *post-mortem* est évaluée le plus souvent à travers la mesure du pH à 15 min *post-mortem*. Elle dépend principalement de la vitesse d'hydrolyse de l'ATP, ou de l'activité « ATPasique » des ATPases (Bendall, 1973 ; Hambrecht et al., 2005). Elle varie donc en fonction du type de fibres musculaires. Ainsi, les muscles riches en fibres à contraction rapide possèdent une activité ATPasique élevée et donc une vitesse de chute de pH plus rapide que les muscles à contraction lente (Choe et al., 2008 ; Lefaucheur, 2010 ; Debut et al., 2003). En outre, les conditions qui précèdent l'abattage, dites « ante-mortem », peuvent constituer des facteurs importants

influençant la vitesse initiale de chute de pH (Wood et Richards, 1975 ; Pearce et al., 2011). Chez le poulet par exemple, l'augmentation de l'activité physique des animaux sur la chaîne d'abattage, estimée au travers de la durée des battements d'ailes, entraîne une diminution plus rapide du pH après la mort (Berri et al., 2005 ; Chabault et al., 2010). En milieu industriel, il est difficile de mettre en œuvre une mesure de la vitesse de chute de pH car elle nécessite le broyage préalable du tissu musculaire dans une solution d'iodoacétate de sodium, qui a la particularité de bloquer instantanément l'activité des enzymes de la glycolyse. Ceci explique pourquoi ce paramètre est rarement mesuré dans les études sur la qualité des viandes de volaille.

- L'amplitude de chute est généralement estimée par la mesure du pH ultime 24 h après abattage. Elle est proportionnelle, pour un muscle donné, à la quantité d'acide lactique produite (Monin, 1988). La mesure du pH ultime est plus facile à mettre en œuvre en milieu industriel puisqu'elle se fait par insertion directe d'une sonde dans la viande.

La vitesse et l'amplitude de chute du pH *post-mortem* varient en fonction du muscle. Ainsi, chez le poulet, les muscles blancs glycolytiques du filet sont caractérisés par une chute de pH plus rapide et un pH ultime plus acide que les muscles de la cuisse qui sont des muscles oxydatifs ou oxydo-glycolytiques (Xiong et al., 1993 ; Berri, 2000 ; Debut et al., 2003). De même, chez la dinde, la chute du pH *post-mortem* est plus rapide dans le muscle pectoral que dans les muscles rouges de la cuisse (Addis, 1986).

Selon Kijowsky et Niewiarowicz (1978), les filets « normaux » de poulet se caractérisent par un pH à 15 min. *post-mortem* proche de 6,2. Il existe cependant une variabilité importante des valeurs de pH₁₅ principalement liée à l'origine génétique des animaux et au type de production (Figure 5) ou aux conditions d'environnement qui précèdent l'abattage tels que le transport, les conditions d'attentes à l'abattoir ou d'accrochage sur la chaîne (Debut et al., 2003 ; Berri et al., 2005).

Fletcher (1999) estime qu'une valeur normale de pH ultime chez le filet de poulet serait de 5,7. D'autres études ont cependant rapporté que chez les volailles les viandes sont dites normales lorsqu'elles possèdent des pH ultimes entre 5,7 et 6,1 (Barbut, 1997 ; Woelfel et al., 1998 ; Barbut et al., 2005). Toutefois, plusieurs facteurs intrinsèques (lignée ou souche, sexe, âge) et extrinsèques (alimentation, conditions *ante-* et *post-mortem*) peuvent influencer le

stockage du glycogène dans le muscle et par conséquent le pH ultime de la viande (Warris et al., 1988 ; Le Bihan-Duval et al., 1999 ; El Rammouz et al., 2004b ; Berri et al., 2008). Selon une enquête récente (INRA/ITAVI) menée dans les abattoirs français, 50% des filets de poulets ont un pH ultime compris entre 5,7 et 5,9. Cependant, les valeurs de pH ultime s'étalent sur une plage de variation beaucoup plus importante comprise entre 5,4 à 6,6 (Gigaud et al., 2011). A titre de comparaison, chez le porc le pHu se situe généralement entre 5,5 et 5,9 (Larzul et al., 1998).

Le pH ultime est en grande partie déterminée par les réserves musculaires en glycogène au moment de l'abattage des animaux (Monin, 1988 ; Daly et al., 2002 ; Berri et al., 2007 ; Choe et al., 2008 ; Le Bihan-Duval et al., 2008). Ainsi, le pH ultime est inversement proportionnel aux quantités d'acide lactique produites à partir du glycogène musculaire pendant la période *post-mortem* (Bendall, 1973 ; Monin, 1988 ; Choe et al., 2008).

Chez le poulet, une forte corrélation génétique négative, de l'ordre de - 0,97, a été mise en évidence entre le potentiel glycolytique (PG) et le pH ultime du filet dans une lignée commerciale de poulet lourd (Le Bihan-Duval et al., 2008). Les corrélations phénotypiques entre ces deux caractères sont aussi significatives, généralement comprises entre - 0,4 et - 0,8 en fonction du type de poulet étudié (El Rammouz et al., 2004 ; Berri et al., 2005b, 2007).

Les réserves en glycogène au moment de la mort sont estimées à travers la mesure du potentiel glycolytique (PG) qui correspond à la quantité de composés glucidiques susceptibles de se transformer en acide lactique lors de la glycolyse musculaire et qui permettent la baisse du pH *post-mortem* (Monin et Sellier, 1985). Il est calculé selon l'équation suivante :

$$PG = 2[(\text{glycogène}) + (\text{glucose}) + (\text{glucose-6-phosphate})] + (\text{lactate})$$

Le potentiel glycolytique d'un muscle est variable. Il dépend en premier lieu du type de muscle : il est ainsi presque deux fois moins important pour un muscle de type rouge lent que pour un muscle de type blanc rapide chez le porc (Larzul et al., 1998 ; Choe et al., 2008 ; Hambrecht et al., 2005). De même, chez le poulet le glycogène musculaire est plus faible dans les muscles de type rouge lent de la cuisse que dans les muscles de type blanc rapide du filet (Debut et al., 2005 ; Ylä-Ajos et al., 2007 ; Zhang et al., 2009). Chez cette espèce, le

Tableau 8 : Variabilité du potentiel glycolytique (PG) dans le muscle de poulet en fonction du type de muscle, de la souche et du type de production.

		Valeurs de PG ¹ moyenne (µg équivalent lactate/g de muscle frais)	Références
Type de muscle	P. major (filet)	115.8	Debut et al., 2005
	<i>Iliotibialis</i> (Cuisse)	74.1	
Type de production	Label (12 sem.)	134,8	Debut et al., 2005
	Standard (6 sem.)	115,8	
	Souche lourde (6 sem.)	129,5	
	Souche lourde (6 sem.)	108	Berri et al., 2007
Age à l'abattage	Souche lourde (5 sem.)	93.3	Baéza et al., 2012
	Souche lourde (6 sem.)	83.9	
	Souche lourde (7 sem.)	84.2	
	Souche lourde (8 sem.)	86.0	
	Souche lourde (5 sem.)	86.7	
Souches URA ²	Y11 (7 sem.)	108	Berri et al., 2001
	Y33 (7 sem.)	97	
	X44 (9 sem.)	98,5	Nadaf et al., 2007
	X33 (9 sem.)	77,4	
	Maigre (9 sem.)	93.6	Sibut et al., 2008
	Grasse (9 sem.)	111,6	

¹Le PG a été évalué à partir d'échantillons de muscle P. major (sauf la donnée pour le muscle *Iliotibialis*) prélevés 15 minutes après la mort de l'animal. Il a été calculé selon la formule suivante : $PG = 2[(\text{glycogène}) + (\text{glucose}) + (\text{glucose-6-phosphate})] + (\text{lactate})$ (Monin et Sellier, 1985)

²Souche Y33, sélectionnée pour un rendement en filet plus élevé et un engraissement abdominal plus faible / souche Y11 (contrôle non sélectionné) ; Souches X44 et X33, sélectionnées de façon divergente sur la vitesse de croissance (vitesse de croissance de X44 << à celle de X33). Souches maigre et grasse, sélectionnées de façon divergente sur l'engraissement abdominal.

potentiel glycolytique varie aussi en fonction du type génétique, du type de production, en particulier de l'âge des animaux (Tableau 8).

L'abattage n'induit pas uniquement des modifications biochimiques au niveau musculaire, mais également des modifications chimiques, physiques et mécaniques. Les principales caractéristiques concernées par ces différents changements sont la couleur, le pouvoir de rétention d'eau et la texture.

III.2. La couleur de la viande

La couleur de la viande est une caractéristique importante qui influence à la fois le choix et l'acceptabilité finale du consommateur. C'est un critère de jugement de la qualité globale jouant un rôle décisif au moment de l'achat car elle est instinctivement rattachée à la fraîcheur du produit (Tikk et al., 2008).

La couleur est déterminée par la réflexion de la lumière qui s'opère sur une épaisseur de viande qui n'excède pas 8 mm. Elle est due à la chromaticité et la luminosité de la viande. Le spectre de la réflexion de la couleur de la viande dépend de sa teneur en pigments, en particulier de la myoglobine et de l'état chimique de cette protéine. La teneur en pigments caroténoïdes, de couleur jaune-orangé, intervient aussi surtout dans le cas des viandes blanches. La couleur est aussi dépendante de la structure musculaire qui influe sur l'absorption et sur la diffusion de la lumière incidente (Monin, 1988 ; Fernandez et al., 2001). La chromaticité est directement liée à la teneur et à l'état d'oxydation des pigments (Miller, 1994), alors que la luminosité est influencée par la structure du muscle (Fernandez et al., 2001). D'une façon générale, la teneur et l'état des pigments héminiques sont les principaux facteurs qui déterminent la couleur des viandes rouges (bovins, ovins, etc.), la couleur des viandes blanches étant surtout influencée par la structure du muscle en lien avec l'état de dénaturation des protéines et la présence des pigments caroténoïdes.

La couleur est généralement mesurée par des méthodes photométriques ou spectrophotométriques (réflectances, coordonnées trichromatiques dans le système Lab CIE $L^*a^*b^*$, ou par mesure de réflectance interne (fibres optiques). Les trois composantes permettant l'évaluation de la couleur de la viande sont : le L^* (Luminance), le a^* (l'indice de

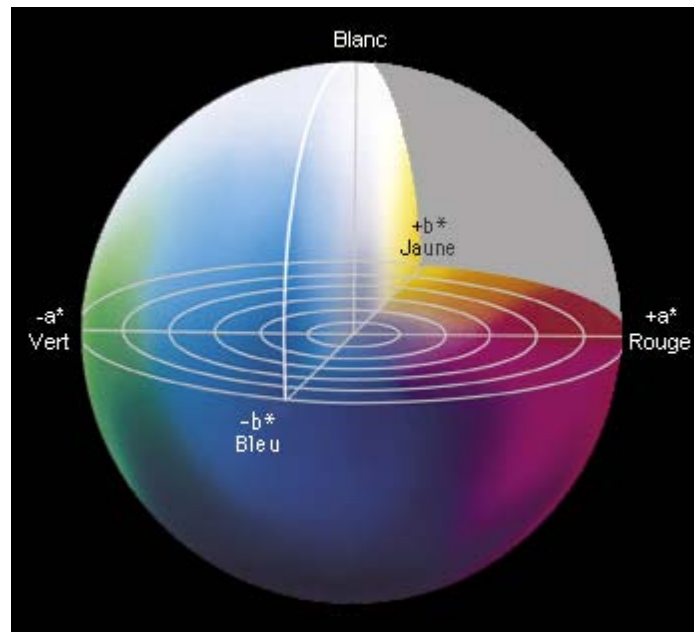


Figure 6 : Représentation de la mesure de la couleur dans le système CIELAB (L^* = luminosité (0 = noir, 100 = blanc), a^* = indice de rouge, b^* = indice de jaune).

rouge) et le b^* (l'indice de jaune) (Figure 6). La valeur de L^* (Luminance ou Réflectance) représente la composante de clarté, c'est un indice de luminosité relatif allant de 0 pour le noir à 100 pour le blanc absolu. Ainsi, lorsque la valeur de L^* est élevée, la viande apparaît pâle et inversement. La valeur de a^* représente la composante chromatique vert-rouge ; celle de b^* la composante bleu-jaune. Lorsque les valeurs de a^* et b^* sont élevées, la viande apparaît plus rouge et jaune, respectivement.

Chez le poulet, plusieurs études ont montré que la luminance (L^*) est étroitement reliée au pH ultime de la viande. Ainsi, des filets possédant des pH ultimes acides présentent des valeurs en L^* élevées (Barbut, 1997 ; Woelfel et al., 1998 ; Fletcher et al., 2000 ; Berri et al., 2005b, 2007). Au niveau génétique, il existe entre le pH ultime et la luminance L^* du filet une corrélation négative généralement très forte, comprise entre -0,6 et -0,9 suivant le type de poulet considéré (Le Bihan-Duval et al., 2001, 2008 ; Chabault et al., 2010). L'étude de Chabault et al. (2010) a aussi montré que chez une souche de poulet de type Label, l'indice de rouge était en grande partie lié au niveau d'activité des oiseaux avant l'abattage. Ainsi, il existe une corrélation génétique négative de -0,6 entre la durée des battements d'ailes sur la chaîne d'abattage et l'indice a^* du filet.

L'origine des variations de couleur est multifactorielle. Plusieurs études ont démontré le fort impact de l'origine génétique mais aussi de l'âge des animaux. L'étude de Abeni et Bergolio (2001) indique que lorsque les poulets sont comparés au même âge, l'indice de rouge (a^*) peut varier entre types génétiques alors que la valeur de la luminance (L^*) n'est pas affectée. Cependant, Berri et al. (2001) rapportent que les types génétiques sélectionnés pour la croissance, le rendement en filet et contre le pourcentage en gras abdominal présentent des filets significativement plus clairs, moins rouges et moins jaunes par rapport aux types génétiques contrôles non sélectionnés. Ces différences de couleur s'expliquent en partie par la moindre teneur en pigments héminiques du muscle pectoral des oiseaux présentant une forte croissance musculaire. De même, Culioli et al. (1990) indiquent que les poulets de type Label à croissance lente ont des cuisses plus riches en pigments héminiques et donc plus rouges que les poulets de type standard. Dans la mesure où il y a une accumulation des pigments avec l'âge (Ouhayoum et Dalle-Zotte, 1993), ce résultat s'explique par le fait que les poulets Label sont plus âgés (12 semaines) que les poulets de type standard (6 semaines) au moment de l'abattage. Si l'on compile l'ensemble des études réalisées à l'URA (et donc utilisant la même

Tableau 9 : Variabilité des paramètres de couleur¹ (L*, a*, b*) du muscle P. major de poulet de la souche et du type de production.

	L*	a*	b*	Références
Souches commerciales				
Standard Ross (6 sem.)	49.7	-0.96	7.5	Berri et al., 2001
Label Hubbard (12 sem.)	50.1	1.62	7.3	Debut et al., 2003
Standard Hubbard (6 sem.)	51.2	2.69	8.3	
Label Hubbard (12 sem.)	50.7	0.43	8.5	Berri et al., 2005b
Certifié Hubbard (8 sem.)	52.8	-0.03	9.2	
Standard Hubbard (6 sem.)	52.6	-0.36	9.1	
Label Hubbard (12 sem.)	51.0	0.96	11.3	Berri et al., 2005a
Standard Hubbard (6 sem.)	51.9	0.20	9.1	
Lourd Hubbard (6 sem.)	53.9	-0.37	8.7	
Lourd Hubbard (6 sem.)	54.9	-0.80	11.8	Berri et al., 2007
Label Hubbard (12 sem.)	48.7	-2.24	7.2	Baéza et al., 2009
Géline de Touraine (17 sem.)	45.1	-0.73	7.8	
Standard Ross	47.4	0.13	6.7	Mercier et al., 2008
Lourd Ross (5 sem.)	48.7	-0.04	8.7	Baéza et al., 2012
Lourd Ross (6 sem.)	46.9	-0.12	9.0	
Lourd Ross (7 sem.)	46.2	-0.38	9.4	
Lourd Ross (8 sem.)	45.3	0.29	8.3	
Lourd Ross (9 sem.)	46.9	-0.01	7.8	
Souches URA²				
Y11 (7 sem.)	48.4	0.64	10.9	Berri et al., 2001
Y33 (7 sem.)	49.8	0.20	10.4	
X44 (9 sem.)	48.3	-0.20	9.4	Nadaf et al., 2007
X33 (9 sem.)	45.6	1.60	13.3	
Maigre (9 sem.)	44.8	-0.28	9.3	Sibut et al., 2008
Grasse (9 sem.)	47.4	-1.01	8.3	

¹Les paramètres de couleur ont été mesurés 24 h *post-mortem* avec un spectrocolorimètre portable Hunterlab.

²Souche Y33, sélectionnée pour un rendement en filet plus élevé et un engraissement abdominal plus faible / souche Y11 (contrôle non sélectionné) ; Souches X44 et X33, sélectionnées de façon divergente sur la vitesse de croissance (vitesse de croissance de X44 << à celle de X33). Souches maigre et grasse, sélectionnées de façon divergente sur l'engraissement abdominal.

procédure de mesure), la variabilité liée à l'origine des animaux est évidente (Tableau 9). Elle suggère à la fois des différences liées au patrimoine génétique des animaux mais aussi à leur âge d'abattage et leur type de production. Les conditions de stress *ante-mortem* peuvent aussi influencer la couleur des filets, notamment leur indice de rouge (a^*) qui augmente par exemple avec l'allongement de la durée d'accrochage avant l'abattage (Debut et al., 2005). Dans le cas particulier des indices de rouge (a^*) et de jaune (b^*) plusieurs études soulignent que ces paramètres sont aussi influencés par l'alimentation. En effet, les ingrédients de la ration, en particulier les micronutriments liposolubles comme les caroténoïdes (de couleur jaune-orange) et la vitamine A, influencent en partie les différentes composantes de la couleur de la viande (Akiba et al., 2001 ; Surai, 2002 ; Li et al., 2008).

III.3. Le pouvoir de rétention d'eau

Le pouvoir de rétention d'eau (PRE) représente la capacité de la viande à retenir l'eau qui s'écoule spontanément après la découpe ou au moment des applications de forces externes comme le chauffage et la pression. Il dépend essentiellement du degré de rétrécissement latéral des myofibrilles au cours de l'installation de la rigidité cadavérique et de la modification associée de la compartimentation de l'eau dans le tissu musculaire (Huff-Lonergan et Lonergan, 2005). Comme mentionné précédemment, l'eau existe dans le muscle sous 3 formes : liée, immobilisée et libre. L'eau liée représente seulement 5 à 10 % de l'eau totale musculaire, elle est fixée par des forces électrostatiques aux groupements fonctionnels des protéines du muscle. L'eau libre représente 90 à 95 % de l'eau totale musculaire, elle comprend l'eau immobilisée dans les espaces extracellulaires ainsi que l'eau retenue par les myofibrilles et le réticulum sarcoplasmique. Cependant, c'est uniquement l'eau libre surtout celle retenue au niveau des myofibrilles qui affecte la capacité de rétention d'eau de la viande (Bertram et al., 2002 ; Huff-Lonergan et Lonergan, 2005). Après abattage, deux facteurs peuvent modifier l'état du réseau protéique myofibrillaire et donc le pouvoir de rétention d'eau :

- l'évolution du pH
- la fixation des filaments fins (actine) et épais (myosine) à l'entrée de la *rigor mortis*.

Les protéines de la viande, principalement les protéines myofibrillaires, sont amphotères. Elles ont une charge nette qui dépend du pH. Au point isoélectrique (pI) de ces protéines

(environ 5,2), les charges positives sont égales aux charges négatives donc la charge nette est nulle, le réseau protéique est resserré et le pouvoir de rétention d'eau est au minimum. C'est seulement lorsque que le pH s'écarte de ce point isoélectrique que les protéines se chargent (positivement ou négativement) et se repoussent. Le réseau protéique s'écarte alors laissant plus ou moins de place disponible pour l'eau ce qui entraîne une augmentation du pouvoir de rétention d'eau. Le pouvoir de rétention en eau est donc très fortement lié au pH ultime de la viande : plus celui-ci est acide (c'est-à-dire se rapprochant du pI) plus la charge des protéines et la capacité de rétention en eau de la viande seront faibles. Par ailleurs, il a été montré que plus la chute du pH sera rapide après la mort des animaux plus la dénaturation des protéines sera importante (Van Laack et al., 2000), ce qui entraînera aussi une faible rétention d'eau. Ce phénomène est d'autant plus marqué lorsque la chute rapide de pH est associée à une température élevée dans le muscle (Zhu et al., 2011).

D'une manière générale, la capacité de rétention d'eau du muscle affecte les pertes en eau au cours du stockage de la viande fraîche mais aussi les rendements technologiques lors de la transformation de la viande en produits élaborés (Fernandez et al., 2002). C'est donc un paramètre important qui à la fois implique des retombées sur le plan économique pour l'industriel mais aussi sur l'acceptabilité du produit par les consommateurs.

Chez les volailles comme chez les autres espèces d'intérêt agronomique, le pouvoir de rétention d'eau de la viande est largement influencé par les variations de pH *post-mortem* (Barbut et Mittal, 1993). Ces auteurs ont démontré que chez la dinde, le PRE augmente significativement avec l'augmentation du pH de la viande. Les pertes en eau au cours du stockage, qui constituent une façon d'évaluer le PRE de la viande, sont corrélées négativement avec le pH ultime (El Rammouz et al., 2004 ; Berri et al., 2005, 2007 ; Janisch et al., 2011). De même, les rendements de transformation par saumurage-cuisson (procédé utilisé lors de la fabrication de blancs ou de jambons de poulet) augmentent avec le pH ultime de la viande (Berri et al., 2005b). Dans le cas des poulets de type Label, ce paramètre est aussi modérément positivement corrélé avec le pH du muscle mesuré 15 minutes *post-mortem*, suggérant aussi un rôle de la vitesse initiale de chute du pH dans le contrôle de ce caractère (Berri et al., 2005b).

III.4. Texture

La texture et par extension la tendreté constitue des paramètres très importants de la qualité organoleptique de la viande (Smith et Fletcher, 1988 ; Fletcher, 2002 ; Christensen et al. 2011). La forte progression de la consommation de produits élaborés et surtout des découpes au détriment des carcasses consommées entières est en partie à l'origine de la prise en compte des paramètres de texture et de dureté de viande chez les volailles. En effet, chez cette espèce comme chez les autres espèces d'intérêt agronomique, la texture de la viande varie en fonction de plusieurs facteurs tels que le type génétique, le sexe et l'âge de l'animal (Koohmaraie, 1996). Par ailleurs, le type métabolique et l'état de contraction du muscle squelettique (souvent liés aux pratiques entourant l'abattage) constituent des facteurs majeurs impliqués dans la détermination de la texture de la viande.

En comparant deux types génétiques, Farmer et al. (1997) ont rapporté des différences significatives au niveau de la texture de la viande. Ces auteurs ont mentionné que les poulets de souche ISA 657 (à croissance lente) présentent des filets plus tendres alors que les poulets Ross (à croissance rapide) ont des cuisses plus tendres. Les travaux de Touraille et al. (1985) et Culioli et al. (1990) ont démontré que la viande des poulets de type Label Rouge présente une texture plus ferme que celle des poulets de type standard (le type le plus produit et commercialisé en France). En revanche, à un âge différent mais à un poids égal, Chambers et al. (1989) n'ont pas mis en évidence de différence significative au niveau de la tendreté du muscle pectoral entre des poulets à croissance rapide et ceux à croissance lente.

L'âge des animaux semble constituer un facteur déterminant pour la texture de la viande de volailles. En effet, lorsque l'âge des animaux augmente, l'hypertrophie des fibres musculaire s'accompagne d'une maturation de l'endomysium, d'un épaissement du périmysium et de la formation des liaisons covalentes entre les molécules de collagène, conduisant ainsi à une diminution de la solubilité du collagène et par conséquent de la tendreté de la viande (Maltin et al., 2003 ; Abdullah et Marterneh, 2010). La tendreté de la viande chez le poulet est corrélée négativement (-0,29) avec l'épaisseur de l'endomysium mais positivement (+0,20) avec celui du périmysium suggérant que ces deux membranes musculaires interviennent dans l'élaboration de la qualité sensorielle de la viande et qu'elles doivent être prises en compte dans l'évaluation de la tendreté (Liu et al., 1996 ; An et al., 2010). D'ailleurs, Chen et al.

(2007) ont rapporté que la force de cisaillement est corrélée positivement avec l'âge (0,80) ainsi qu'avec le diamètre (0,83) et l'aire (0,75) des myofibrilles, et négativement avec la densité des myofibrilles (-0,85) dans le muscle de poulet. La diminution de tendreté avec l'âge explique en grande partie les différences de propriétés sensorielles qui existent entre les filets des poulets Labels, abattus à 12 semaines, et les poulets standards, abattus à un âge environ deux fois plus faible, la viande des poulets Labels étant nettement plus ferme que celle des poulets standards (Culioli et al., 1990 ; Berri et al., 2007).

Le sexe des animaux pourrait aussi avoir un effet sur la texture de la viande, mais les résultats restent controversés. Certaines études indiquent que les filets des poulets mâles sont plus tendres que ceux des femelles (Culioli et al., 1990 ; Abdullah et Materneh, 2010). Par contre, dans les travaux réalisés par Lyon et al. (1992) et Musa et al. (2006), les filets des poulets mâles sont jugés plus durs que ceux des femelles. Northcutt et al. (2001) quant à eux n'observent aucun effet du sexe sur la tendreté du filet chez le poulet.

La cinétique de mise en place de la *rigor mortis* et l'évolution précoce du pH *post-mortem* sont aussi largement impliqués dans la détermination de la texture de la viande (Skarovsky et Sams, 1999 ; Monsón et al., 2004). Leurs rôles sont particulièrement important lorsque la viande est découpée précocement après la mort de l'animal (découpe à chaud). Dans ce cas, les muscles, détachés de leurs tendons, se contractent entraînant un raccourcissement irréversible des sarcomères (les unités de contraction musculaire). Cette contracture et les conséquences négatives en terme de tendreté sont d'autant plus fortes que les muscles sont en capacité de produire de l'ATP. Ceci explique pourquoi ce phénomène de contracture *post-mortem* est maximal dans les premières heures qui suivent l'abattage. Ce processus est aussi accentué par le froid qui favorise la libération des ions Ca^{2+} dans la cellule et donc la contraction des fibres. Pour cette raison, on parle souvent dans la littérature de contracture au froid ou « cold-shortening ». La longueur des sarcomères et donc l'état de contraction du muscle peuvent être évalués par diverses techniques : microscopie optique, diffraction sous un rayon laser ou par analyse d'image. Chez le poulet comme chez les autres espèces, plus la longueur des sarcomères est faible plus la viande est dure (Bilgili et al., 1989). Des corrélations négatives allant de -0,38 à -0,43 selon le type de poulet ont d'ailleurs été montrées entre la longueur des sarcomères et la résistance au cisaillement (Berri et al., 2007). Pour atténuer les effets négatifs de la découpe à chaud des carcasses sur la tendreté des filets

de poulet, il est nécessaire d'adapter les procédures de traitements des carcasses. Le plus efficace est de respecter un délai entre abattage et découpe suffisamment long (environ 4h). Il est aussi possible de réduire la cinétique de refroidissement ou d'appliquer la stimulation électrique sur les carcasses dans le but d'accélérer la glycolyse *post-mortem* et ainsi d'éviter la contracture du muscle au moment de la découpe. Chez le poulet, la stimulation électrique à haut voltage (500 V, 100 Hz pendant 60 s), technique appliquée après la saignée des poulets, provoque ainsi une diminution significative de la longueur des sarcomères des filets de poulets (Kahraman et al., 2011). En outre, certaines études indiquent que la force de cisaillement de la viande est aussi corrélée négativement au pH ultime de la viande (Dunn et al., 1993 ; Chabault et al., 2010). D'ailleurs, il existe aussi une corrélation positive entre la luminance (L^*), critère corrélé négativement au pH ultime, et la texture de la viande évaluée par la mesure de la force de cisaillement (Zhuang et Savage, 2010).

Au cours de la maturation, la structure myofibrillaire est modifiée par l'action des enzymes protéolytiques (Maltin et al., 2003). Dans le muscle de poulet comme dans celui-ci des mammifères, les systèmes protéolytiques calpaïnes/calpastatine et cathepsines/cystatines semblent fortement impliqués dans la mise en place de la tendreté de la viande (Maltin et al., 2003 ; Lee et al., 2008). Ces deux systèmes influencent d'une manière directe la texture de la viande *via* la protéolyse ou de manière indirecte *via* des modifications d'autres caractéristiques musculaires comme l'évolution du pH *post-mortem* ou le pouvoir de rétention en eau (Veeramuthu et Sams, 1999).

La température de cuisson ainsi que le marinage des viandes vont aussi affecter la texture de la viande (Murphy et Marks, 2000 ; Lyon et al., 2001 ; Alvarado et McKee, 2007). En effet, les propriétés de texture de la viande sont le résultat de modifications physico-chimiques au niveau des fibres musculaires et des tissus conjonctifs (épimysium et périmysium). Ainsi, la texture de la viande est considérablement affectée par la température de cuisson qui provoque des changements aux niveaux des membranes musculaires, des protéines solubles et des protéines myofibrillaires ainsi que du collagène. Des modifications au sein de ces paramètres pendant la cuisson pourraient influencer significativement la texture de la viande de volailles (Zayas et Naewbanij, 1986).

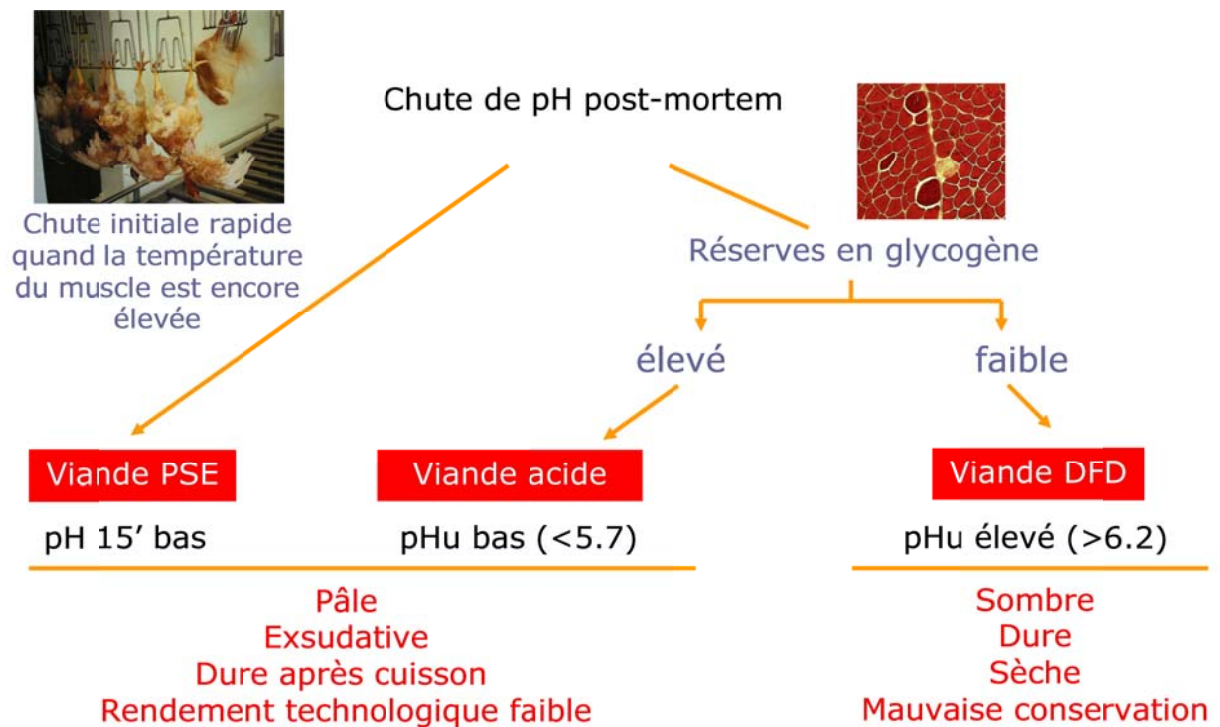


Figure 7. Impact de la cinétique de chute de pH *post-mortem* sur les caractéristiques de la du filet de poulet

PSE : Pale, Soft, Exudative ; DFD : Dark Firm Dry ; pH 15' : pH mesuré 15 minutes *post-mortem* ; pHu : pH mesuré 24 heures *post-mortem*.

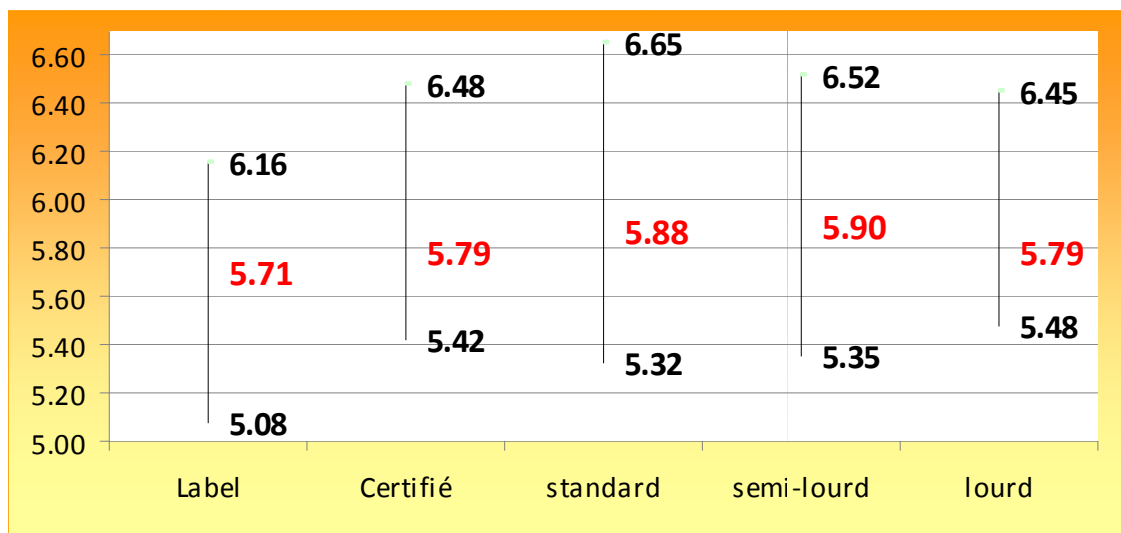


Figure 8. Variabilité par type de production du pH ultime de filets de poulets mesuré en abattoir industriel ($n \approx 8000$) (Berri et al., 2010).

III.5. Variabilité de qualité observée sur le terrain

Des enquêtes ont été réalisées entre 2008 et 2010 pour faire un état des lieux des problèmes de qualité actuellement rencontrés en abattoirs français pour l'ensemble des filières de productions (standards, Label Rouge, Certifié, poulets lourds). Elles ont été réalisées dans un nombre important d'abattoirs en considérant en priorité les problèmes de qualité des filets de poulet liés aux variations de pH. En effet comme le résume la Figure 7, la vitesse initiale (pH15) et l'amplitude (pHu) de chute de pH *post-mortem* vont déterminer un nombre important de paramètres de qualité de viande tels que la couleur, le pouvoir de rétention en eau, la texture ainsi que les aptitudes à la conservation et à la transformation.

Le premier constat est l'hétérogénéité de qualité très importante rencontrée sur le terrain (Gigaud et al., 2009 ; Berri et al., 2010). Elle concerne l'ensemble des filières et a pour origine des variations conséquentes de pH ultime (Figure 8) qui vont impacter un nombre important de paramètres tels que la couleur, la texture et les rendements technologiques de la viande. En effet, parallèlement aux mesures de pH ont été effectuées d'autres mesures de qualité afin d'estimer l'impact que pouvait avoir les variations de pH observées sur les propriétés technologiques et sensorielles de la viande (Gigaud et al., 2009). Ceci a permis de confirmer l'impact très important du pHu sur les caractéristiques de couleur, en particulier la luminance L^* , mais aussi le pouvoir de rétention en eau et la dureté de la viande cuite et d'évaluer par un jury de dégustateurs les conséquences au niveau sensoriel. Ainsi, les viandes à pHu élevé sont perçues comme des viandes sombres et tendres après cuisson tandis que les viandes acides sont décrites comme des viandes pâles, dures, avec un arrière goût d'acidité (Gigaud et al., 2009).

Ceci a aussi permis de déterminer les seuils de pH à partir desquels les principaux défauts de qualité liés aux variations de pH ultime apparaissaient : $\leq 5,7$ pour les viandes acides et $\geq 6,2$ pour les viandes DFD. Il a par la suite été possible de classer les viandes par rapport à ces valeurs seuils et de quantifier précisément leur proportion par filières de productions (Figure 9). Ainsi, environ 20% des filets de poulets standards peuvent être classés comme viande acide. La proportion de filets acides atteint même 30 et 50% dans le cas de la production Certifiée et Label Rouge, respectivement. L'apparition de viande DFD est nettement moins

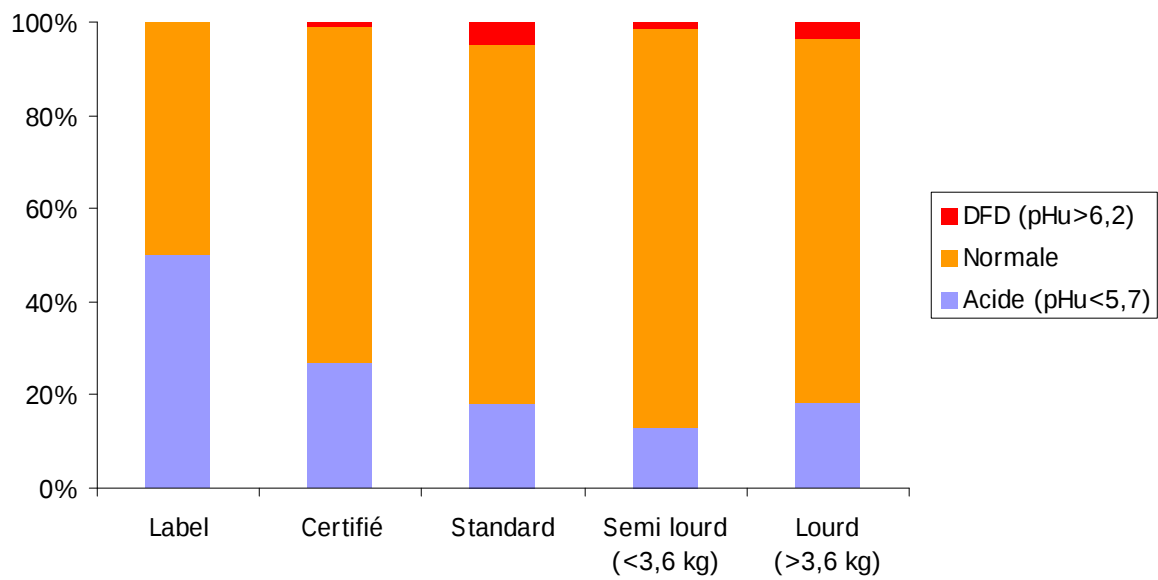


Figure 9. Fréquence d'apparition des défauts de qualité de viande liés aux variations de pH ultime dans les abattoirs français (enquêtes 2008 à 2010, $n \approx 8000$) (Berri et al., 2010).

fréquente (généralement inférieure à 5%) et concerne uniquement les productions de poulets standards et lourds.

Globalement, les variations de qualité reportées sur le terrain sont préjudiciables pour les abatteurs-transformateurs qui souhaitent à la fois proposer au consommateur des produits standards et fiables en termes de valeur sensorielle et nutritionnelle mais aussi être compétitifs en optimisant leurs rendements de fabrication. Plus largement, les informations recueillies en abattoirs industriels soulignent l'importance de la maîtrise du pH ultime de la viande si l'on veut à terme homogénéiser et optimiser la qualité de la viande de volaille. Si le pH ultime de la viande apparaît comme une cible clef à maîtriser pour optimiser la qualité de la viande chez les volailles, elle ne doit pas faire oublier l'importance d'autres caractéristiques qui vont aussi contribuer à l'établissement des caractéristiques finales de la viande. C'est le cas des lipides par exemple qui reflètent en grande partie le profil en acides gras de l'alimentation des volailles et vont déterminer la valeur nutritionnelle et diététique de la viande (Rymer & Givens, 2005). C'est aussi le cas des pigments, caroténoïdes en particulier, qui vont influencer l'intensité de la coloration particulièrement dans le cas des viandes blanches. Dans tous les cas, ceci implique d'acquérir des connaissances sur les facteurs à l'origine des variations de qualité mais aussi sur les mécanismes physiologiques sous-jacents à ces variations. Les deux paragraphes suivants seront consacrés à la présentation des mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle du glycogène musculaire, déterminant majeur du pH ultime, et des pigments caroténoïdes qui interviennent dans l'établissement de la coloration des viandes chez les volailles.

Partie C. LE GLYCOGENE MUSCULAIRE : FACTEUR DETERMINANT DE LA QUALITE DE LA VIANDE

Le glycogène est une macromolécule de la famille des glucides constituée de nombreuses unités de glucose (Figure 10). Il constitue une réserve énergétique importante supportant l'activité musculaire (Goldfarb et al., 1989 ; Shulman et Rothman, 2001). Dans le muscle squelettique, il existe deux formes distinctes de glycogène qui diffèrent par leurs solubilités en milieu acide : le proglycogène (insoluble) et le macroglycogène (soluble) (Adamo et Graham, 1998), présentant des vitesses de renouvellement différentes (Graham et al., 2001 ; Rosenvold et al., 2002). Chez les volailles comme chez les mammifères, l'évolution du pH de la viande

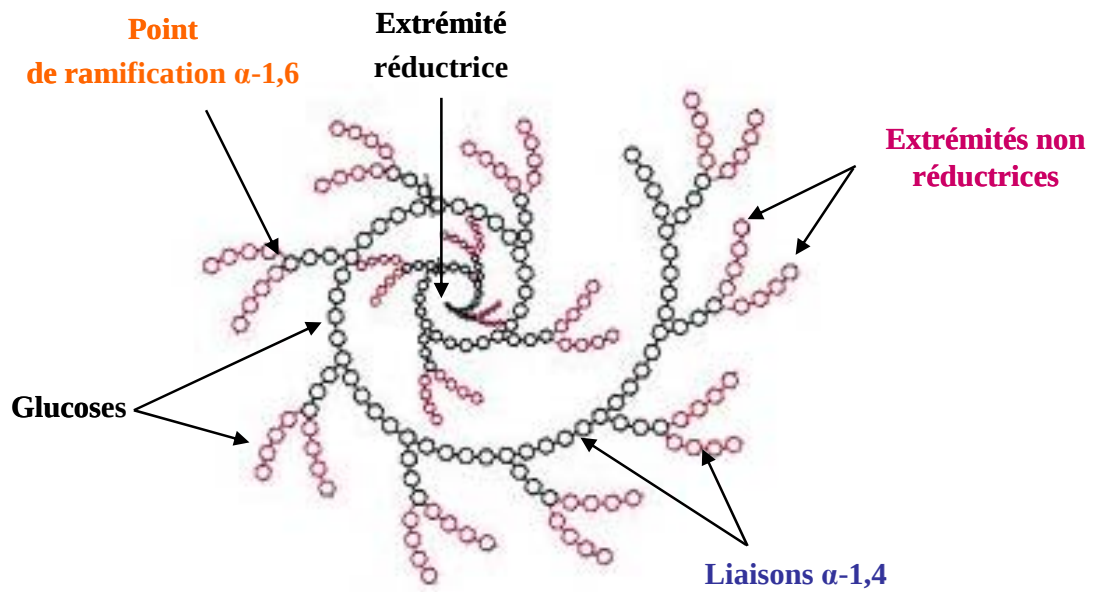


Figure 10. Structure schématique du glycogène.

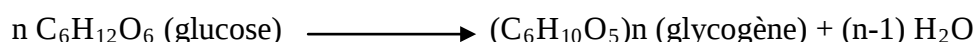
Le glycogène est mis en réserve essentiellement dans le foie et le muscle squelettique. Il est composé d'un polymère de glucose présentant des liaisons osidiques α -1,4 et des ramifications α -1,6.

après la mort de l'animal est en grande partie déterminée par la teneur en glycogène du muscle au moment de l'abattage (Le Bihan-Duval et al. 2008). Ces réserves énergétiques musculaires disponibles au moment de la mort constituent de ce fait un élément déterminant de la qualité à travers leur action sur le pH ultime (Berri et al., 2005, 2007 ; Le Bihan-Duval et al., 2001, 2008 ; Sibut et al., 2008 ; Yalçin et al., 2010). Ainsi, la compréhension des mécanismes contrôlant la qualité des viandes, implique au préalable des travaux sur le métabolisme glucidique, en particulier sur les mécanismes physiologiques déterminant la synthèse, le catabolisme et le stockage du glycogène dans le muscle. Comme chez les mammifères, différentes voies métaboliques impliquant des kinases intracellulaires peuvent être activées pour réguler le métabolisme du glucose par le muscle afin d'assurer l'homéostasie. Dans ce paragraphe, nous présenterons les principales voies directement impliquées dans la synthèse (la glycogénogenèse) et la dégradation (la glycogénolyse) du glycogène, ainsi que certaines données sur l'implication de l'AMP-activated protein kinase (AMPK) dans la régulation du métabolisme du glycogène en relation avec la qualité de la viande.

I. Principales voies métaboliques impliquées dans le métabolisme du glycogène

I.1. La glycogénogenèse

Chez les oiseaux comme chez les mammifères, l'excès de glucose alimentaire est mis en réserve sous forme du glycogène dans le foie et les muscles. La glycogénogenèse est la voie métabolique qui permet la synthèse de glycogène à partir du glucose dans le foie et dans le muscle. Le mécanisme qui aboutit à la synthèse du glycogène à partir d'un nombre important de molécules de glucose est résumé par la formule :



La glycogénogenèse permet d'éviter l'accumulation excessive de glucose dans le sang (hyperglycémie). Elle est stimulée par l'insuline permettant ainsi la pénétration du glucose dans les cellules musculaires, par l'intermédiaire des transporteurs de glucose (GLUT) préalable à la polymérisation du glucose en glycogène. Elle débute par l'action de la

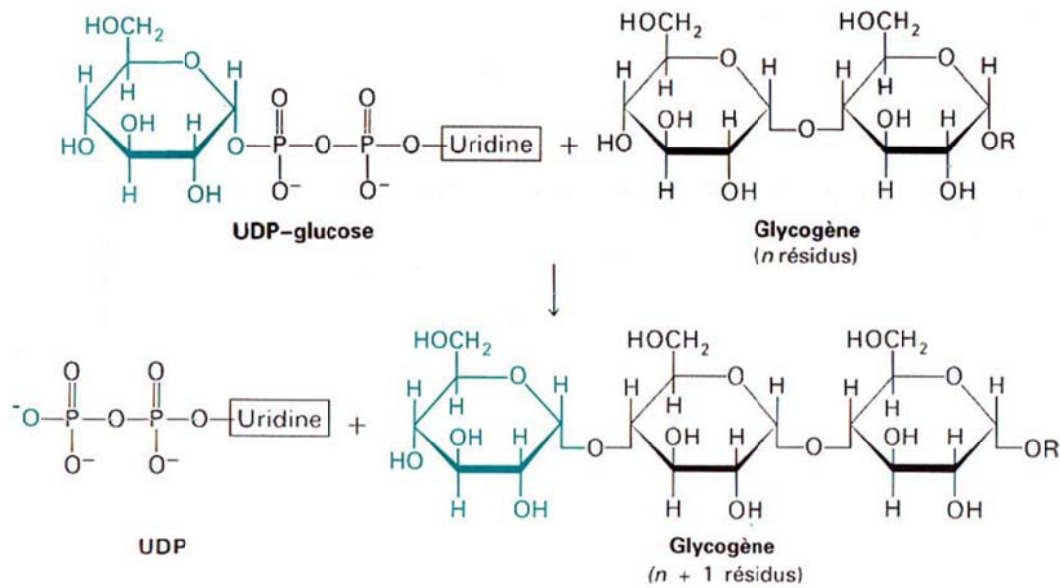


Figure 11. Transformation du glycogène (n résidus) en glycogène (n + 1 résidus) catalysée par la glycogène synthase (GYS).

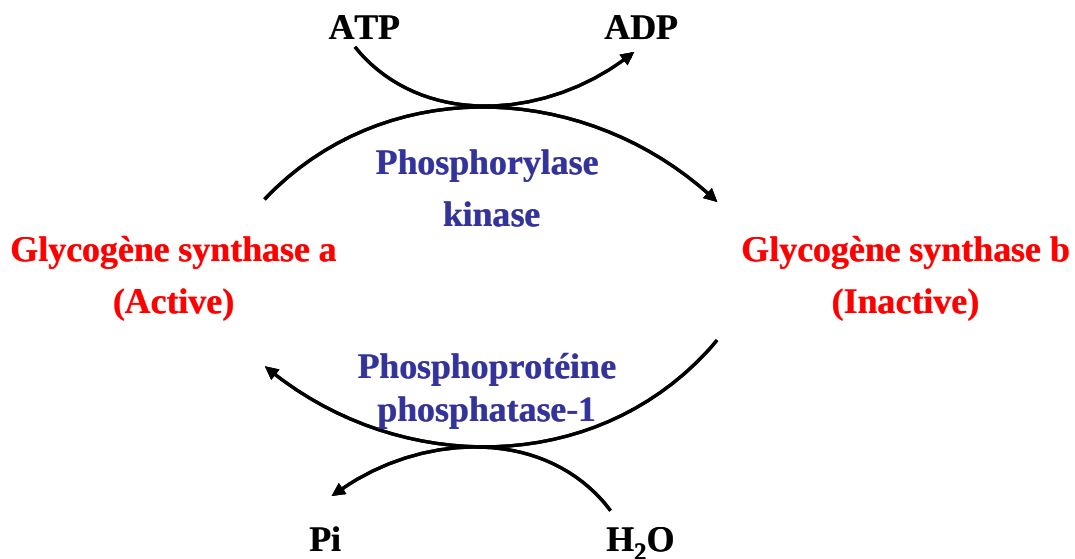


Figure 12. Glycogène synthase (GYS).

La GYS existe sous deux formes : une forme déphosphorylée active (GYSa) catalysée par la protéine phosphatase-1 (PP-1) et une forme phosphorylée inactive (GYSb) par la protéine kinase. ATP: adénosine triphosphate; ADP: adénosine diphosphate; Pi: phosphate inorganique

glucokinase (dans le foie) ou de l'hexokinase (dans le muscle) qui phosphoryle le glucose en glucose-6-phosphate (G-6-P) qui sera isomérisé en glucose-1-phosphate (G-1-P) par la phosphoglucomutase. Le G-1-P est activé par l'Uridine Triphosphate (UTP) entraînant la formation d'UDP-glucose *via* l'action de l'UDP-glucose-phosphorylase. Une fois activés, les UDP-glucoses se lient les uns après les autres à la chaîne en voie d'élongation. Après fixation d'un certain nombre de résidus glycosyles, l'enzyme branchante transfère un bloc de 5 à 8 unités en C6 d'un résidu d'au moins 11 unités, entraînant la formation d'une ramification, puis, le passage d'une molécule de glycogène de n à $n+1$ molécule de glucose par l'intermédiaire de la glycogène synthase (Figure 11).

I.1.1. La glycogène synthase (GYS)

Aussi appelée glycogène synthétase, la glycogène synthase est codée par le gène GYS, exprimé dans la plupart des tissus, en particulier dans le foie et dans le muscle (Pederson et al., 2004 ; Skurat et al., 2006). C'est une enzyme très active dans la synthèse du glycogène stocké au niveau hépatique et musculaire (Ferrer et al., 2003 ; Pederson et al., 2004 ; Skurat et al., 2006).

Il existe une forme musculaire, la GYS1 (84 kDa) et une forme hépatique, la GYS 2 (81 kDa). Quel que soit le tissu, la GYS existe sous deux formes : une forme déphosphorylée active (forme a) et une forme phosphorylée peu active ou inactive (forme b) (Queiroz-Claret et al., 2000 ; Figure 12). L'activité de cette enzyme est contrôlée *via* des réactions de phosphorylation et de déphosphorylation catalysées par la protéine kinase et la protéine phosphatase 1 (PP-1), respectivement (Skurat et al., 2006). Deux sites de phosphorylation sont présents dans les dix premiers acides aminés de la partie NH₂-terminale de l'isoforme musculaire de la GYS (GYS1). Il existe aussi d'autres sites de phosphorylation situés dans la partie C-terminale (3a, 3c, 4, 5, 1a, et 1b) (Roach, 1991) où la phosphorylation au niveau du site 3a (Ser641) joue un rôle crucial dans l'inactivation de l'enzyme GYS (Wang et Roach, 1993 ; Skuart et Dietrich, 2004). La GYS est contrôlée par la glycogène synthase kinase 3 (GSK-3), enzyme régulée en aval par la protéine kinase B ou Akt (Cross et al., 1995), ou encore par l'AMP-activated protein kinase (AMPK). La GYS est aussi régulée par des effecteurs allostériques, tels que le glucose-6-phosphate (G-6-P) qui agit comme activateur

de cette enzyme (Roach, 1991 ; Nielsen et Wojtaszewski, 2004 ; Bouskila et al., 2008 ; Baskaran et al., 2010).

Dans le foie, la surexpression de la GYS induite par l'activation de la glucokinase (GK), augmente l'accumulation du glycogène dans ce tissu (Gomis et al., 2000 ; Ferrer et al., 2003). Dans le muscle, le contrôle du métabolisme du glycogène passe par différentes étapes. Ainsi, des études réalisées sur des animaux transgéniques surexprimant la GYS ont montré que le contrôle de la synthèse du glycogène est partagé entre le transport du glucose assuré par les transporteurs du glucose (en particulier le GLUT4), et l'activité GYS (Manschester et al., 1996 ; Azpiazu et al., 2000). Ces auteurs rapportent aussi que la surexpression de GYS dans le muscle augmente la teneur du glycogène musculaire. Toutefois, l'augmentation importante de l'activité de la GYS induit une diminution sensible du niveau d'UDP-glucose, limitant l'accumulation du glycogène par rétrocontrôle négatif. Azpiazu et al. (2000) ont rapporté que le contrôle du glycogène ne dépend pas de la capacité de phosphorylation du glucose dans la cellule, mais plutôt de la stimulation de l'apport du glucose par GLUT4 et de l'activité de la GYS induite par l'insuline. En effet, l'activité de la GYS dans le muscle est sous le contrôle hormonal du glucagon (inhibant l'activité de l'enzyme) et de l'insuline (activant la synthèse du glycogène) (Barry et al., 2006).

I.1.2. La glycogène synthase kinase 3 (GSK-3)

La GSK-3 est une sérine/thréonine kinase initialement identifiée comme régulateur de la glycogène synthase (GYS), nommée ainsi glycogène synthase kinase-3 (Embi et al., 1980). Chez les mammifères, il existe deux isoformes distinctes de GSK-3 exprimées de façon ubiquitaire : GSK-3 α (51 kDa) et GSK-3 β (49 kDa), codées par deux gènes distincts (Woodgett, 1990 ; Latif et Pillay, 2008). Cependant, chez les oiseaux, il n'existe que l'isoforme GSK-3 β (Alon et al., 2011).

La régulation de l'activité GSK-3 est complexe. Elle est assurée par des réactions de phosphorylation et de déphosphorylation. Au repos, la GSK-3 est très active. Elle peut être inactivée par phosphorylation par l'insuline au niveau de la sérine 21 de la GSK-3 α et la sérine 9 de la GSK-3 β (Cross et al., 1995 ; Fang et al., 2000). Cette inhibition par l'insuline nécessite l'activation de la phosphatidyl inositol-3-kinase (PI-3K), activateur de la protéine

kinase B (PKB/Akt), induisant ainsi la phosphorylation de la GSK-3 au niveau de ces deux résidus sérine régulateurs (Cross et al., 1995). En absence d'insuline, la GSK-3 régule négativement la GYS par phosphorylation, réduisant ainsi la capacité des cellules à synthétiser et à stocker du glycogène (Lawrence et Roach., 1997). L'inhibition de la GSK-3 par la phosphorylation sur ces deux sérines 9 et 21 (Ser 21/9), induit l'activation de la GYS par déphosphorylation, conduisant à des taux accrus de synthèse de glycogène (Parker et al., 1983 ; Cohen et al., 1997). Cependant, selon Bouskila et al. (2008), l'activation de la GYS par l'insuline chez les mammifères reste possible sans recours à la voie GSK-3/GYS, suggérant que la régulation allostérique de la GYS par le G-6-P peut jouer un rôle clé dans la stimulation de la synthèse du glycogène par l'insuline. La GSK-3 interviendrait aussi dans d'autres processus biologiques comme régulateur essentiel de la signalisation neuronale et dans le comportement de nombreuses espèces y compris le poulet (Alon et al., 2011). Elle interviendrait également dans la synthèse des acides gras, *via* la phosphorylation et l'inactivation de l'ATP-citrate lyase (Benjamin et al., 1994 ; Hughes et al., 1992) ; enzyme responsable de la libération de l'acétyl-CoA (le substrat de la synthèse des acides gras) à l'extérieur de la mitochondrie. La GSK-3 phosphoryle et inactive l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) qui assure le transfert du bicarbonate afin d'activer l'acétyl-CoA cytoplasmique en malonyl-CoA, métabolite intermédiaire de la synthèse des acides gras (Hughes et al., 1992).

II. La glycogénolyse

La glycogénolyse est une voie métabolique active en période de jeûne permettant l'utilisation des réserves de glycogène hépatique pour alimenter la glycolyse ou pour maintenir la glycémie. C'est la réaction inverse de la glycogénogenèse, généralement réalisée dans le foie et dans les muscles, avec cependant des fins différentes. Ainsi, en situation de jeûne, le foie joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie. Il assure un taux constant de la glycémie, permettant de couvrir les besoins énergétiques du cerveau et des cellules glucodépendantes telles que les globules rouges. Cet équilibre est assuré par la présence de transporteurs du glucose insulino-dépendants, de récepteurs du glucagon. En plus, la présence de l'enzyme glucose-6-phosphatase accorde au foie le pouvoir de libérer le glucose en quantité importante dans le sang. Les muscles stockent le glucose pour une utilisation ultérieure, ils ne peuvent en aucun cas fournir du glucose au sang ou pour d'autres organes puisque ils ne possèdent ni la glucose-6-phosphatase permettant la conversion du G-6-P en

glucose ni les transporteurs membranaires spécifiques du G-6-P. De cette manière, tout le glucose entrant dans les muscles est strictement utilisé par les muscles leur permettant ainsi de couvrir leurs propres besoins énergétiques pendant quelques jours en cas de jeûne. La glycogénolyse a lieu dans le cytosol des cellules, à l'exception de la réaction d'hydrolyse du G-6-P en glucose grâce à la glucose-6-phosphatase, qui a lieu dans le réticulum endoplasmique des cellules hépatiques.

II.1. La glycogène phosphorylase kinase (PHK)

La PHK est un tétrahétéromère composée de trois sous-unités régulatrices α , β et δ , et d'une sous-unité catalytique γ avec un poids moléculaire total de 1300 kDa. Les sous-unités régulatrices α et β inhibent l'activité catalytique de la sous-unité γ . La sous-unité régulatrice δ contient un site de fixation du Ca^{2+} . Elle est exprimée dans de nombreux tissus mais elle est particulièrement représentée dans le foie et le muscle (Pickett-Gies et Wash, 1986). La PHK catalyse la phosphorylation et l'activation de la glycogène phosphorylase (PYG), enzyme cruciale de la glycogénolyse.

L'activation de la PHK se fait par phosphorylation au niveau de sa sous-unité catalytique. Une étude *in vitro* a montré que l'AMPK peut phosphoryler la PHK sur au moins deux sites de phosphorylation des sous-unités α et β (Pickett-Gies et Wash, 1986). Cette phosphorylation agit simultanément avec les ions Ca^{2+} , augmentant ainsi l'activité de la PHK. La PHK peut être partiellement activée par des concentrations de Ca^{2+} de l'ordre de 6 à 10 M. Cette activation passe par le site de fixation du calcium présent sur la sous-unité δ . Dans le muscle squelettique, ce mode d'activation est important puisque la contraction musculaire est déclenchée par la libération de Ca^{2+} . Donc la dégradation du glycogène musculaire est déclenchée en partie par une augmentation de la concentration de Ca^{2+} . Ce dernier forme avec la calmoduline (protéine monomérique, ubiquitaire) un complexe calmoduline-calcium permettant par ailleurs l'activation de l'AMPK par phosphorylation au niveau de la thréonine 172 à travers l'activation de l'AMPK-kinase (AMPKK) par la Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase (CaMKK) (Hurley et al., 2005 ; Shen et al., 2007). Les ions Ca^{2+} peuvent aussi activer l'AMPK sans former le complexe calmoduline/calcium, en synergie avec l'AMP (activateur allostérique de l'AMPK) (Fogarty et al., 2010).

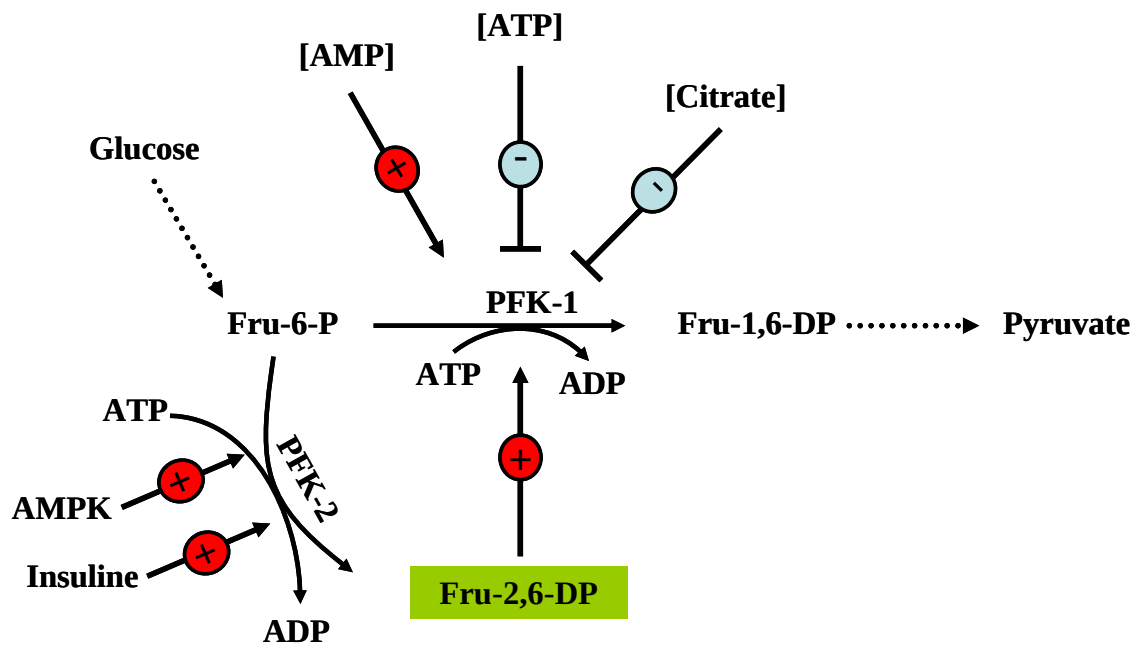


Figure 13. Activateurs et inhibiteurs de la conversion du fructose-6-phosphate (Fru-6-P) en fructose-1,6-diphosphate (Fru-1,6-DP) par la phosphofructokinase-1 (PFK-1).

ATP: adénosine triphosphate; ADP: adénosine diphosphate; AMP : adénosine monophosphate ; AMPK : AMP-activated protein kinase

II.2. Les phosphofructokinases (PFK)

Les PFK sont des enzymes glycolytiques limitantes (Sola-Penna et al., 2010), catalytiques du transfert irréversible du phosphate à partir de l'ATP vers le fructose-6-phosphate (Rhoades et al., 2005 ; Shen et al., 2006a ; 2006b ; Scheffler et Gerard, 2007). Il existe deux isoformes de PFK : la PFK-1 et la PFK-2.

La PFK-1 est un tétramère de 340 kDa dont la composition en sous-unités est tissu-dépendante. Chez le poulet comme chez l'homme, il existe une forme musculaire et une forme hépatique de la PFK-1 (Seki et al., 2006). Elle assure la conversion du fructose-6-phosphate (Fru-6-P) produit au cours de la glycolyse en fructose-1,6-diphosphate (Fru-1,6-DP) (Figure 13).

Elle est activée de manière allostérique par le fructose-2,6-diphosphate (Fru-2,6-DP) (Cai et al., 1996 ; Schliselfeld et Danon, 1996) et l'AMP, dont les concentrations sont élevées lorsque les réserves énergétiques de la cellule sont faibles. Elle est activée aussi par l'insuline et l'AMPK (Shen et al., 2006). Par contre, son activité est inhibée par le $\text{NADH} + \text{H}^+$, le FAD, l'ATP (Cai et al., 1996), et l'acide citrique, qui constituent des marqueurs de charge énergétique élevée.

La PFK-2 intervient dans la régulation de l'activité de la PFK-1. C'est un homodimère de 55 kDa qui possède une double activité enzymatique antagoniste : une activité kinase catalysant la phosphorylation du fructose-6-phosphate (Fru-6-P) en fructose-2,6-diphosphate (Fru-2,6-DP) par l'ATP (Schliselfeld et Danon, 1996), et une activité phosphatase qui catalyse la réaction inverse. L'activité phosphatase de la PFK-2 est favorisée par la phosphorylation de la sérine-32 catalysée par la voie AMPc/protéine kinase A sous l'effet du glucagon (Okar et al., 2001). Celui-ci a donc indirectement pour effet d'arrêter la glycolyse en favorisant la formation de fructose-6-phosphate à partir du fructose-2,6-diphosphate, ce qui diminue l'activité de la PFK-1. A l'inverse, la déphosphorylation de la sérine-32 est catalysée par la protéine-phosphatase-1 (PP-1) sous l'effet du fructose-6-phosphate, dont le taux augmente en même temps que celui du glucose. Dans ce cas, l'activité kinase PFK-2 convertit le fructose-6-phosphate en fructose-2,6-diphosphate, ce qui réactive la PFK-1 (Schliselfeld et Danon, 1996) et donc la glycolyse, avec pour conséquence de faire chuter le taux de glucose dans le cytoplasme.

II.3. La glycogène phosphorylase (PYG)

La glycogène phosphorylase est codée par le gène PYG exprimé dans la plupart des tissus mais surtout dans le foie et le muscle. La PYG assure la conversion du glycogène en glucose-1-phosphate, correspondant à la première étape de la glycogénolyse (Roach, 2002 ; Ferrer et al., 2003).

Le monomère de la PYG présente un poids moléculaire d'environ 97 kDa. Il existe une forme musculaire et une hépatique. Chacune existe sous deux formes, la forme a (active) phosphorylée au niveau de la sérine 14 de chaque sous-unité, et la forme b (quasiment inactive) qui est déphosphorylée (Buchbinder et al., 2001 ; Roach, 2002 ; Ferrer et al., 2003).

Dans le foie, la PYG est dimérique. La forme inactive (b) peut passer à la forme active (a) par phosphorylation. Dans le muscle squelettique, la PYG est formée de 4 sous-unités. Lorsqu'elles sont groupées en dimères, la PYG est inactive (b). Après phosphorylation les dimères s'assemblent en tétramère et la forme devient active (a).

Dans le muscle squelettique comme dans le foie, la PYG est considérée comme une enzyme limitante dans la gestion des réserves glucidiques (Dairou et al., 2007). Son activité peut être contrôlée par phosphorylation *via* la glycogène phosphorylase kinase (PHK) ou par des facteurs allostériques comme l'AMP. L'ATP peut agir comme effecteur allostérique négatif en entrant en compétition avec l'AMP. De même, le glucose-6-phosphate inhibe l'activation de la PYG en se fixant sur le site AMP.

III. L'AMP-activated protein kinase (AMPK) : régulateur clef du métabolisme du glycogène

III.1. Structure et propriétés

L'AMPK est une serine/thréonine kinase, composée de trois sous unités : α , β et γ (Hardie et Sakamoto, 2006). Ces sous-unités sont présentes sous plusieurs isoformes (α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , γ_1 , γ_2 et γ_3) codées par sept gènes distincts (α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , γ_1 , γ_2 et γ_3). Des orthologues des trois sous-unités sont retrouvés chez tous les eucaryotes (Hardie, 2005 ; Hardie et Sakamoto,

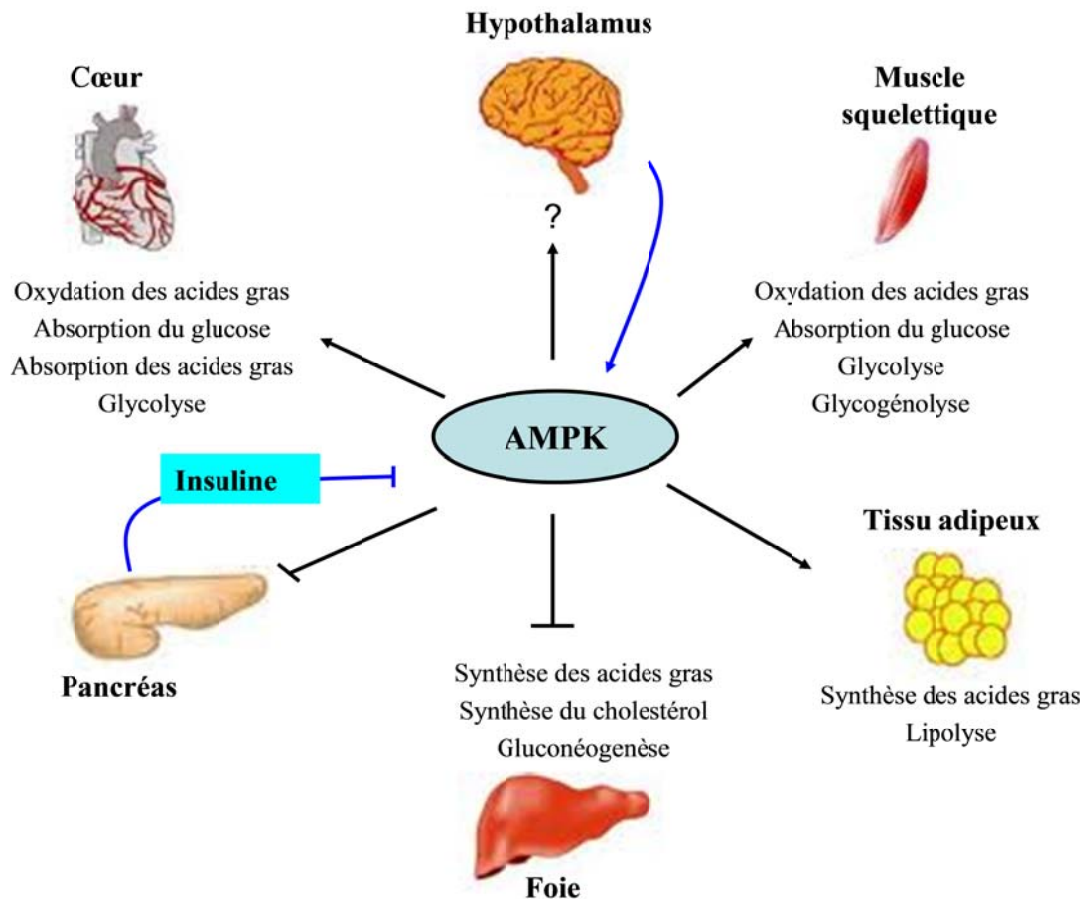


Figure 14. Distribution et fonctions l'AMP-activated protein kinase (AMPK).

L'AMPK est exprimée dans la majorité des tissus. Elle constitue un senseur énergétique impliqué dans les réactions de dégradation et de synthèse du métabolisme énergétique.

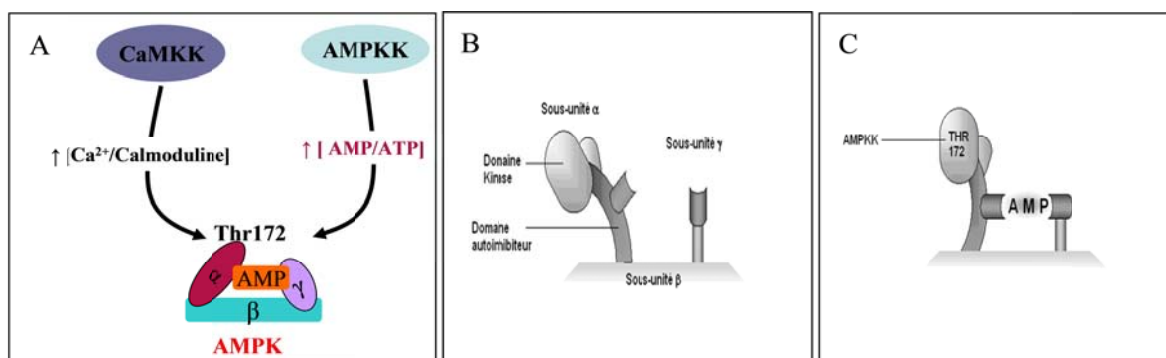


Figure 15. Activation de l'AMPK (A) et modèle d'association de ses sous-unités en absence (B) ou en présence d'AMP (C) (adapté de Winder, 2001).

A : Activation de l'AMPK par phosphorylation au niveau de sa thréonine 172 (Thr172). B : Conformation inactive, C : Conformation active. AMPKK : AMP-activated protein kinase kinase, CaMKK: calcium/calmoduline-dependant protein kinase kinase, AMP : Adénosine monophosphate, ATP : adénosine triphosphate, Thr : Thréonine.

2006). La sous-unité α est l'unité catalytique qui possède l'activité kinase. Les sous-unités β et γ sont des unités régulatrices. Elles sont indispensables pour l'activation de l'AMPK. La sous-unité γ contient un domaine de liaison à l'AMP (Cheung et al., 2000) alors que la sous-unité β présente un domaine de liaison au glycogène (Hudson et al., 2003 ; Polekhina et al., 2003). Cette sous-unité de l'AMPK joue aussi un rôle de support physique pour les deux autres sous-unités α et γ (Suter et al., 2006).

La distribution de l'AMPK est ubiquitaire (Figure 14). Elle est exprimée au niveau du cerveau, des reins, des poumons, du pancréas, du foie, des testicules, des muscles squelettiques et cardiaque (Woods et al., 1996). L'expression relative des différentes sous-unités et de leurs isoformes varie selon les tissus analysés. Ainsi, l'expression des sous-unités α_1 , β_1 , γ_1 et γ_2 est ubiquitaire. Les sous-unités α_2 et β_2 sont exprimées principalement dans le foie et les muscles squelettiques et cardiaque. En revanche, la sous-unité γ_3 est exprimée exclusivement dans les muscles squelettiques (Berl, 1994 ; Cheung et al., 2000), en particulier dans les muscles de type glycolytique (Barnes et al., 2004). Cette sous-unité est non détectable dans le foie, le cerveau et le tissu adipeux (Mahlapuu et al., 2004).

D'une façon générale, le modèle d'activation de l'AMPK proposé implique que l'AMPK α est spécifiquement phosphorylée sur un résidu thréonine (Thr172) par l'AMPK kinase (AMPKK) suite à une fixation d'une molécule d'AMP sur la sous-unité γ (Hawley et al., 1996 ; Winder, 2001 ; Figure 15). En effet, l'AMP permet l'interaction du domaine auto-inhibiteur avec la sous-unité γ , ce qui libère le site de phosphorylation de la sous-unité α . Plus spécifiquement, il a été rapporté que la sous-unité β pourrait induire un changement de conformation de la sous-unité α , ce qui favoriserait son interaction avec la sous-unité γ via l'AMP, permettant ainsi l'activation de la sous-unité α et l'assemblage adéquat et stable du complexe (Cheung et al., 2000; Winder, 2001).

Plusieurs études ont suggéré que la liaison de l'AMP à la sous-unité α induirait une amplification de la phosphorylation de l'AMPK par l'AMPKK accompagnée d'une diminution de l'affinité des protéines phosphatases, notamment celles qui déphosphorylent l'AMPK (Ruderman et al., 1999 ; Winder, 2001). Récemment, une nouvelle kinase activée par augmentation des concentrations cellulaires en ions Ca^{2+} , appelée Ca^{2+} /calmodulin-

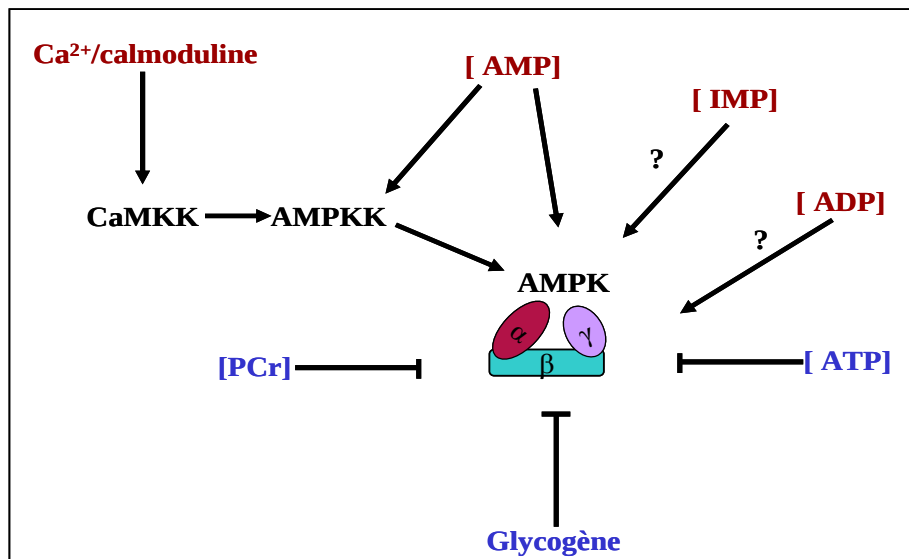


Figure 16. Activateurs et inhibiteurs de l'AMP-activated protein kinase (AMPK).

AMPKK: AMP-activated protein kinase kinase; CaMKK: calcium/calmoduline-dependant protein kinase kinase; ATP: adénosine triphosphate; ADP: adénosine diphosphate; AMP: adénosine monophosphate; IMP: inosine monophosphate; PCr: phosphocréatine.

dependent protein kinase kinase ou CaMKK, a été identifiée comme régulateur de l'AMPK (Abbot et al., 2009).

L'AMPK peut être activée aussi d'une manière allostérique par plusieurs métabolites (Figure 16). Elle est activée par la créatine mais selon un mécanisme différent de celui de l'AMP (Stephens et al., 2002). Cependant, l'activation de ce complexe protéique dépend uniquement du rapport AMP/ATP et non pas de celui de la créatine/créatine phosphate (Suter et al., 2006). A l'inverse, l'ATP et la créatine phosphate peuvent inhiber l'activation de l'AMPK (Winder, 2001). L'IMP (inosine monophosphate) peut stimuler l'AMPK, mais seulement en association avec l'AMP accompagnée d'une diminution des concentrations cellulaires en ATP (Shen et al., 2006). En plus du site d'activation au niveau de la thréonine 172, d'autres sites de phosphorylation sur les sous-unités α et β ont été identifiés, mais ils ne semblent avoir aucun effet sur l'activité de l'AMPK (Woods et al., 2003).

III.2. Régulation du métabolisme du glycogène par l'AMPK

L'AMPK est un régulateur clé du métabolisme énergétique y compris les métabolismes glucidique, protéique et lipidique (Dzamko et Steinberg, 2009). Les effets de l'activation de l'AMPK s'observent non seulement au niveau hépatique, mais aussi au niveau des tissus périphériques comme les muscles, le pancréas, le tissu adipeux et au niveau central dans l'hypothalamus (Lage et al., 2008). Généralement, le métabolisme du glycogène est régulé par des réactions de phosphorylation et de déphosphorylation qui sont gouvernées par des facteurs hormonaux, alimentaires et par des modulateurs allostériques (Lawrence et al., 1986 ; Young et al., 1996). Par ailleurs, l'AMPK qui représente un modulateur important des voies impliquées dans la synthèse et l'utilisation de l'énergie (Lage et al., 2008), peut jouer un rôle crucial dans le métabolisme du glycogène dans le foie et le muscle squelettique. L'utilisation des activateurs pharmacologiques de l'AMPK comme le 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside (AICAR), a d'ailleurs montré que l'AMPK stimule la glycogénolyse par activation de la glycogène phosphorylase (Longnus et al., 2003) et inhibe la glycogénèse par inhibition de la glycogène synthase (Aschenbach et al., 2002).

La concentration en glycogène musculaire, et donc le statut nutritionnel, peuvent contrôler l'activité de l'AMPK, notamment en réponse à la contraction musculaire (Ihlemann et al.,

2000). En effet, au cours de la contraction musculaire, il y a une augmentation des besoins en énergie du muscle, impliquant l'utilisation de substrats énergétiques riches en phosphate tels que l'ATP et la créatine phosphate. A mesure que le muscle se contracte, les ratios AMP/ATP et créatine/créatine phosphate augmentent, modifiant ainsi leurs équilibres et l'activation de l'AMPK et le transport du glucose dans le muscle en contraction (Winder et Hardie, 1999 ; Winder, 2001; Fujii et al., 2000, 2005). Puisque l'équilibre de ces ratios varie en fonction de l'intensité et de la durée du travail musculaire, le transport du glucose ainsi que l'activation de l'AMPK sont positivement corrélés à l'intensité de l'exercice ainsi qu'à la force et à la fréquence des contractions (Rasmussen et Winder, 1997 ; Ihlemann et al., 2000 ; Shen et Du, 2005). Les exercices à haute intensité chez l'homme et le rat ont révélé une augmentation sélective de l'activité de la sous-unité α_2 de l'AMPK et non de la sous-unité α_1 (Wojtaszeki et al., 2000 ; Musi et al., 2001). Lors de l'exercice à faible intensité, aucun changement de l'activité de ces deux isoformes n'a été rapporté (Wojtaszewski et al., 2000 ; Fujii et al., 2000, 2005). Par ailleurs, Stephens et al. (2002) ont suggéré que l'activation de l'AMPK, en réponse à la contraction, dépend de la teneur du muscle en glycogène. En comparant des rats ayant une teneur en glycogène musculaire faible ou élevée, la contraction active le transport du glucose et l'AMPK de façon plus importante chez les rongeurs dont le contenu en glycogène musculaire est faible par rapport aux animaux dont le contenu est élevé (Derave et al., 2000). L'effet inhibiteur du glycogène sur l'AMPK varie donc en fonction du type du muscle. En effet, dans les muscles pauvres en glycogène comme les muscles oxydatifs (muscles rouges lents), la contraction induit une augmentation de la captation du glucose et de l'activité de l'AMPK. En revanche, dans les muscles riches en glycogène comme les muscles glycolytiques (muscles blancs rapides), la contraction peut induire une augmentation du transport du glucose sans aucune activation de l'AMPK (Derave et al., 2000). Les effets de la contraction sur l'AMPK peuvent varier aussi en fonction du statut alimentaire des animaux, l'AMPK étant d'avantage stimulée chez des rats à jeûn par rapport à des rats nourris (Ai et al., 2002).

IV. AMPK et qualité de la viande

Le rôle de l'AMPK dans le contrôle du métabolisme énergétique *post-mortem*, en particulier celui du glycogène musculaire, a été mis en évidence chez plusieurs espèces (Du et al., 2005 ; Copenhaver et al., 2006 ; Shen et al., 2006 ; Shen et al., 2008 ; Granlund et al., 2011 ;

Sibut et al., 2008). Des études *in vivo* ont montré que l'AMPK est activée dans le muscle cardiaque ou squelettique suite à l'ischémie ou l'hypoxie (Kim et al., 2004). Lorsque le muscle cardiaque ou squelettique est exposé à un environnement pauvre en oxygène, la glycolyse anaérobie est la première source qui procure de l'énergie, ce qui augmente rapidement le rapport AMP/ATP. L'augmentation de ce rapport, comme il est indiqué précédemment, induit l'activation de l'AMPK qui contrôle par la suite la glycolyse par plusieurs voies. L'AMPK peut activer la glycogène phosphorylase par l'intermédiaire de la phosphorylase kinase stimulant ainsi la glycogénolyse, tout en inhibant la glycogène synthase par phosphorylation au niveau des sérines 9 et 21 (ser 21/9). Elle peut aussi activer par phosphorylation la phosphofructokinase-2 (PFK-2), enzyme catalysant la formation du fructose 2,6-bisphosphate, activateur allostérique de la phosphofructokinase-1 (PFK-1), enzyme limitante de la glycolyse (Shen et al., 2006 ; Scheffler et Gerrard, 2007). Donc l'AMPK pourrait moduler la qualité de la viande à travers la régulation de la glycolyse *post-mortem* et son implication dans les processus de transformation du muscle en viande.

Des études menées chez le porc et la souris ont mis en évidence l'implication de l'AMPK dans le contrôle de la dégradation du glycogène *post-mortem* et de la transformation du muscle en viande (Du et al., 2005 ; Shen et Du, 2005 ; Shen et al., 2006). Ces études ont montré que l'AMPK permet le maintien de l'activité de la glycogène phosphorylase (GYP) et de la glycogénolyse/glycolyse dans le muscle après l'abattage. L'activité de l'AMPK pourra notamment influencer le pH ultime de la viande *via* le contrôle de la teneur du muscle en acide lactique (Bergeron et al., 1999 ; Young et al., 1996 ; Shen et Du, 2005). Ainsi, les muscles de souris soumises à un exercice intense ou traitées par un activateur pharmacologique de l'AMPK (AICAR) ont des pH ultimes plus acides que ceux des souris témoins. Inversement, des souris KO dépourvues du gène AMPK soumises à des exercices physiques ou non, présentent des pH *post-mortem* supérieurs en comparaison avec des souris sauvages (Shen et Du, 2005). De même, l'infusion de muscles squelettiques avec un inhibiteur de l'AMPK (le compound C) immédiatement avant la mort de l'animal, induit une inhibition de la glycolyse *post-mortem* et la hausse du pH musculaire (Shen et al., 2008).

Des mutations au niveau du gène PRKAG3 codant pour la sous-unité régulatrice γ_3 de l'AMPK sont associées à des variations en glycogène musculaire chez différentes espèces (Milan et al., 2000 ; Barnes et al., 2004). Chez le porc de race Hamsphire, une mutation

dominante (RN-) spécifique du gène PRKAG3, entraîne une diminution de l'activité de l'AMPK et une augmentation du contenu en glycogène musculaire (Estrade et al., 1994 ; Milan et al., 2000). Cette mutation est favorable à la production de viandes dites acides qui sont caractérisées par un pH ultime faible et des rendements technologiques médiocres dus essentiellement à une faible capacité de rétention en eau (Barbut et Mittal, 1993 ; Janisch et al., 2011).

Chez le poulet de chair, l'implication de l'AMPK dans le contrôle des réserves en glycogène musculaire *in vivo* et la qualité de la viande a récemment été étudiée. En comparant deux génotypes sélectionnés pour ou contre l'engraissement abdominal et présentant aussi des différences de glycogène musculaire, il a été possible de montrer des régulations à la fois en termes d'expression d'ARN mais aussi de niveaux de phosphorylation de l'AMPK (Sibut et al., 2008). Ainsi, les gènes codant pour les isoformes α_2 et γ_1 étaient sous-exprimés et les gènes codant pour les isoformes β_1 et γ_2 étaient surexprimés dans le muscle pectoral des poulets maigres (moins riches en glycogène) par rapport aux poulets gras. Ces modifications étaient accompagnées d'un fort différentiel en terme de phosphorylation de l'AMPK sur la thréonine 172 (Thr172), la lignée maigre se caractérisant par des niveaux de phosphorylation de l'AMPK environ 3 fois supérieurs à ceux observés dans le muscle de la lignée grasse. Compte-tenu de l'action inhibitrice de l'AMPK sur la synthèse du glycogène et son action activatrice sur sa dégradation, les niveaux de phosphorylation supérieurs observés chez les poulets maigres étaient cohérents avec la faible teneur en glycogène de leurs muscles. En terme de qualité, la phosphorylation supérieure de l'AMPK dans le muscle des poulets maigres correspondaient à une viande moins acide, plus foncée, moins exsudative et potentiellement mieux adaptée à la transformation.

Partie D. LES CAROTENOIDES : FACTEURS DETERMINANTS DE LA COULEUR

Chez les volailles comme chez les autres espèces d'intérêt agronomique, la couleur de la viande constitue un facteur de qualité important pour le consommateur ainsi que pour l'industrie de la viande. Elle dépend de nombreux facteurs dont l'importance varie d'une espèce ou d'un type de viande à l'autre. Ainsi, la couleur des viandes rouges (bovines en particulier) est principalement déterminée par les pigments héminiques et leur état chimique

(plus ou moins oxydé). La couleur des viandes blanches sera aussi influencée par d'autres types de pigments, notamment les caroténoïdes de couleur jaune-orangée et qui sont apportés par l'alimentation. Dans la nature, environ 600 à 700 caroténoïdes ont été identifiés et caractérisés jusqu'à présent. Dans ce paragraphe, les différentes voies impliquées dans la dégradation, l'absorption et l'accumulation des caroténoïdes seront décrites, ainsi que les rôles des différents facteurs alimentaires et génétiques qui régulent le métabolisme des caroténoïdes. Le rôle des caroténoïdes dans la détermination de la couleur des tissus, en particulier celle de la viande, sera par la suite abordé.

I. Généralités

Les caroténoïdes sont des pigments liposolubles très répandus dans la nature. Ils sont synthétisés par les plantes photosynthétiques, les algues et certains microorganismes. Les animaux et l'homme sont incapables de synthétiser les caroténoïdes, ils doivent se les procurer à partir des aliments. Les caroténoïdes proviennent des isoprénoïdes dont la structure de base est formée d'une longue chaîne hydrocarbonée en C₁₈ où s'alternent simples et doubles liaisons. Ils dérivent à partir d'une structure acyclique C₄₀H₅₆, possédant une longue chaîne centrale avec des doubles liaisons conjuguées, formées par hydrogénation, déshydrogénation, cyclisation, oxydation ou par la combinaison de ces différents processus (IUPAC-IUB, 1972 ; Britton, 1995). Tous les caroténoïdes, à l'exception du lycopène, présentent deux cycles en C₆ (β-ionone) situés à chacune des extrémités de la chaîne carbonée. Ces cycles peuvent porter des groupements méthyles, ainsi que des groupes hydroxyles. Cependant, l'union internationale de chimie pure et appliquée (IUPAC) et l'union internationale de biochimie (IUB) recommande d'utiliser le terme général carotène précédé par deux lettres grecques définissant les groupements cycliques terminaux (Britton, 1995).

Les caroténoïdes sont divisés en deux groupes principaux (Figure 17) :

- les caroténoïdes hydrocarbonés appelés couramment les carotènes dont l'α-carotène, le β-carotène et le lycopène sont les principaux représentants. Ces caroténoïdes sont exclusivement hydrocarbonés et donc extrêmement apolaires (Borel et al., 2005).
- Les caroténoïdes oxygénés nommés ordinairement les xanthophylles dont la lutéine, la zéaxanthine, la cryptoxanthine, la canthaxanthine, et l'astaxanthine, sont les principaux représentants. Ils possèdent au moins un groupe d'oxygène qui peut varier

de 1 à 6. Ces xanthophylles sont plus polaires que les carotènes (IUPAC-IUB, 1972 ; Britton, 1995 ; Furr et Clark, 1997 ; Surai et al., 2001).

Les caroténoïdes ont été aussi classés en caroténoïdes provitamines A, appelés encore caroténoïdes prorétinoïdes (Lobo et al., 2011), et non-provitamines A ou non-prorétinoïdes. Le β -carotène possède une forte activité provitaminique A par rapport à l' α -carotène, au γ -carotène et à la β -cryptoxanthine qui possèdent des activités provitaminiques A plus faibles (Goodman, 1984 ; Bendich et Olson, 1989 ; Castenmiller et West, 1998). La lutéine et la zéaxanthine ne sont pas considérées comme des provitamines A (Borel, 2011). Néanmoins, certaines études *in vivo* rapportent que ces deux xanthophylles peuvent posséder de légères activités provitaminiques A, suggérant ainsi que cette classification basée sur l'activité provitaminique A des caroténoïdes, n'est pas totalement élucidée (Weiser et Kormann, 1993 ; Karadas et al., 2005a).

Malgré les différences observées entre les caroténoïdes, ils présentent certaines propriétés physicochimiques communes. Ils sont insolubles dans l'eau, très solubles dans les hydrocarbures chlorés, légèrement solubles dans les huiles végétales et très stables en milieu alcalin. Ils ont des spectres d'absorption généralement compris entre 400 et 500 nm, mais cette gamme peut varier en fonction du nombre de doubles liaisons conjuguées, de la nature du solvant, des substituants et de l'isomérisation *cis-trans* (Tee, 1992). Les caroténoïdes sont très sensibles à la lumière, à la chaleur et aux agents chimiques (Scita, 1993 ; Britton, 1995 ; Yonukera et Nagao, 2007). La déshydratation, la congélation ou le chauffage peuvent modifier l'activité biologique des caroténoïdes et plus particulièrement celles des caroténoïdes oxygénés qui sont plus sensibles à l'oxydation.

II. Métabolisme des caroténoïdes

Bien que le rôle des caroténoïdes soit bien étudié chez plusieurs espèces animales et chez l'homme, certains aspects du métabolisme des caroténoïdes et notamment celui des xanthophylles reste encore méconnu. En effet, la plupart des études ont été consacrées aux caroténoïdes à action provitaminique A, en particulier au β -carotène, ce qui a permis de mieux illustrer leur métabolisme.

II.1. Absorption

Les caroténoïdes sont des pigments liposolubles donc leur absorption suit généralement celles des lipides alimentaires. Parker (1996) rapporte que chaque caroténoïde possède un modèle spécifique d'absorption déterminé par ces propriétés physicochimiques. Ainsi, la structure, la polarité et la configuration (cis ou trans) d'un caroténoïde constituent des facteurs déterminants non seulement pour leur absorption par les cellules intestinales (entérocytes) (Parker, 1996 ; Na et al., 2004), mais aussi pour leur conversion et leur accumulation dans l'intestin, le foie et dans les tissus périphériques comme la rétine, la peau, le tissu adipeux et les muscles squelettiques (Snodderly, 1995 ; Surai et al., 2001 ; Na et al., 2004 ; Chung et al., 2009 ; Wang et al., 2010b)

L'absorption des caroténoïdes alimentaires se fait en plusieurs étapes, commençant par la libération des caroténoïdes de la matrice alimentaire suite à une dégradation mécanique et enzymatique du bol alimentaire. En effet, les caroténoïdes sont soit associés aux protéines alimentaires appelés ainsi des caroténoprotéines (Bryant et al., 1992), soit ils sont incorporés directement dans le supplément vitaminique. De ce fait, l'efficacité de la libération des caroténoïdes de la matrice alimentaire pourrait être influencée par plusieurs facteurs incluant leur disposition physique dans cette matrice ou dans le supplément, la taille des particules alimentaires après leur digestion ainsi que l'efficacité des enzymes digestives surtout d'origine pancréatique représentées par la lipase et son cofacteur la colipase (Parker, 1996).

Les caroténoïdes libérés de la matrice alimentaire sont incorporés par la suite dans la phase lipidique formée grâce aux émulsions gastriques sous l'effet de la bile (Yonekura et Nagao, 2007). Certaines études rapportent que cette étape est critique dans le processus d'absorption des caroténoïdes (Yeum et Russel, 2002 ; Yonekura et Nagao, 2007). Après la phase d'émulsion, les caroténoïdes sont solubilisés dans les micelles mixtes qui sont formées à partir des sels et des phospholipides biliaires, des lipides alimentaires et de leurs produits d'hydrolyse. Les caroténoïdes solubilisés dans les micelles mixtes sont par la suite absorbés par les cellules intestinales (Yonekura et Nagao, 2007 ; Kotake-Nara et Nagao, 2011).

Chez le poulet comme chez la plupart des mammifères, l'absorption des caroténoïdes s'effectue essentiellement au niveau du duodénum et du jéjunum (Surai, 2002) qui constituent

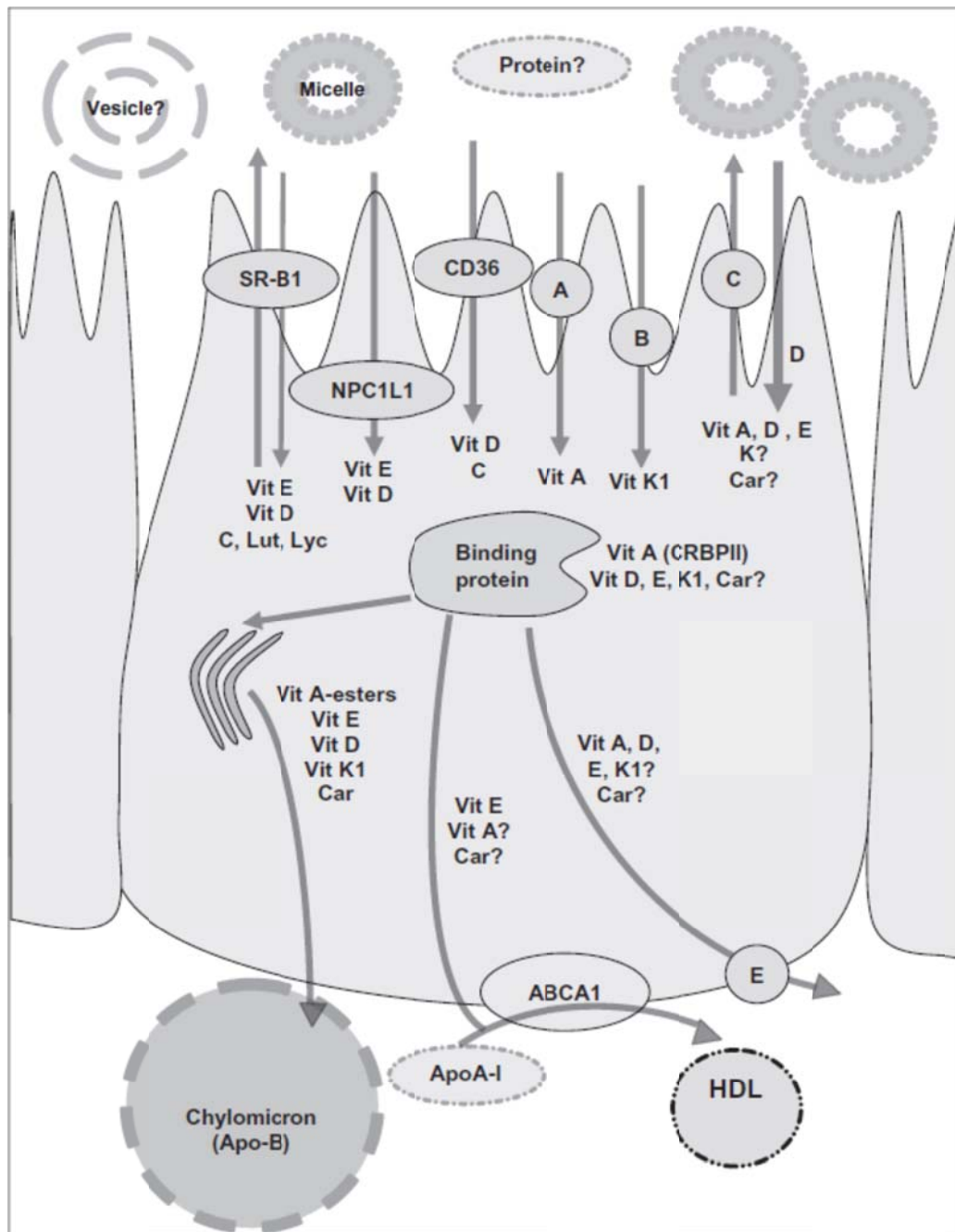


Figure 18. Protéines impliquées dans l'absorption, le transport et la sécrétion des vitamines (A, D, E, K) et des caroténoïdes au niveau de l'entérocyte (D'après Reboul et Borel, 2011).

Vit, vitamine ; C, β -carotène ; Lut, lutéine ; Lyc, lycopène ; Car, caroténoïdes. (A) Transporteur putatif spécifique du rétinol ; (B) Transporteur putatif spécifique de la phylloquinone (vit K1) ; (C) transporteur non identifié des efflux apicaux ; (D) Diffusion passive ; (E) Transporteur non identifié des efflux basolatéraux ; ? = voie putative = . Les vitamines D and E ainsi que les caroténoïdes sont capturés à partir des micelles mixtes par les transporteurs membranaires apicaux: SR-BI (scavenger receptor class B type I), CD36 (cluster determinant 36) and NPC1L1 (Niemann-Pick C1-Like 1) ; CRBP II, cellular retinol binding protein II.

aussi les principaux lieux d'absorption des lipides alimentaires chez cette espèce (Mossab et al., 2001). Le plus souvent, l'ensemble des étapes décrites précédemment est résumé par le terme « bioaccessibilité ». Elle est définie comme le rapport des caroténoïdes solubilisés dans les micelles mixtes par rapport au total des caroténoïdes ingérés. La bioaccessibilité des caroténoïdes varie non seulement selon la nature du caroténoïde et des matrices alimentaires dans lesquelles les caroténoïdes sont incorporés, mais aussi en fonction des différents traitements technologiques appliqués aux aliments tel que le traitement thermique au cours de leur fabrication qui accélère la libération des caroténoïdes suite à la destruction des structures entourant ces micronutriments (Rock et al., 1998 ; Kotake-Nara et Nagao, 2011).

Dans plusieurs espèces, il a été rapporté que les caroténoïdes sont absorbés par la muqueuse intestinale, principalement au niveau du duodénum et du jéjunum, par diffusion passive, similaire à celle du cholestérol et des produits de la lipolyse (Wang, 1994 ; Parker, 1996 ; Furr et Clark, 1997 ; Surai, 2002) pour être à la fin incorporés dans les chylomicrons chez les mammifères et leurs équivalents chez les oiseaux, les portomicrons (Griffin et al., 1982). En revanche, l'identification d'un certain nombre de protéines agissant comme médiateurs du transport des caroténoïdes (Reboul et Borel, 2011 ; Figure 18) a infirmé la singularité de la diffusion passive de ces micronutriments de la lumière intestinale vers les cellules intestinales. Ainsi, au niveau des membranes apicales des villosités, un récepteur membranaire nommé scavenger receptor class B type I (SR-BI) a été identifié comme médiateur de l'absorption des caroténoïdes par les entérocytes (During et Harrison., 2007 ; Yonekura et Nagao, 2007 ; von Lintig, 2010). La protéine SR-BI a été démontrée comme étant indispensable pour l'absorption du β -carotène et de la α -tocophérol chez la souris (van Bennekum et al., 2005 ; Reboul et al., 2006). Elle l'est aussi pour la lutéine, la zéaxanthine et le β -carotène par les cellules intestinales d'origine humaine (Caco-2) (Reboul et al., 2005 ; van Bennekum et al., 2005 ; During et al., 2008 ; Harrison, 2011). Par ailleurs, l'utilisation d'animaux transgéniques et de cultures cellulaires a permis d'identifier une autre protéine appelée cluster determinant 36 (CD36) qui est impliquée dans l'absorption de la lutéine et du lycopène par les adipocytes et le tissu adipeux, principal tissu de stockage des caroténoïdes chez l'être humain (Moussa et al., 2011).

Herron et al. (2006) ont rapporté l'implication d'une autre protéine appelée ATP-binding cassette G5 (ABCG5) dans le métabolisme des caroténoïdes. Elle est reconnue au départ

Tableau 10 : Principales caractéristiques des lipoprotéines chez les volailles (Steinmetz et al., 1998 ; Sato et al., 2009 ; Alvarenga et al., 2011)

Lipoprotéines	Origine	Apoprotéines	Fonction
Portomicrons	Intestinale	B-100, A-I, A-IV, C	Transport des triglycérides exogènes
VLDL	Hépatique	B-100, A-I, C-II, C-III	Transport des triglycérides exogènes et endogènes
IDL	Intravasculaire	B-100, A-I, A-IV	Transport du cholestérol et des triglycérides exogènes et endogènes
LDL	Intravasculaire	A-I, A-IV, B-100	Transport du cholestérol et des triglycérides vers les tissus
HDL	Hépatique / Intravasculaire	A-I, A-II, C-II, C-III	Transport du cholestérol du tissus au foie

comme médiateur des efflux du cholestérol (Mulligan et al., 2003) et des stérols à partir des cellules épithéliales intestinales, mais des études récentes rapportent que la protéine ABCG5 assure l'absorption ou l'excrétion des caroténoïdes les plus polaires, comme la lutéine et la zéaxanthine, de l'intestin vers la lumière intestinale (Borel, 2011; Kotake-Nara et Nagao, 2011). Des études sont toutefois encore nécessaires afin de confirmer le rôle de cette protéine dans le métabolisme des caroténoïdes dans les différents tissus.

II.2. Transport des caroténoïdes dans le sang

Dans le sang, les caroténoïdes et leurs métabolites formés au niveau de la cellule intestinale sont transportés par les lipoprotéines (Parker, 1996). Chez les oiseaux comme chez les mammifères, il existe cinq formes de lipoprotéines (Tableau 10) :

- les portomicrons d'origine intestinale (Bensadoun et Rothfeld, 1972) de tailles et de compositions très similaires aux chylomicrons des mammifères (Griffin et al., 1982),
- les lipoprotéines à très faible densité (Very Low Density Lipoprotein : VLDL) d'origine hépatique,
- les lipoprotéines à densité intermédiaire (Intermediate Density Lipoprotein : IDL) d'origine vasculaire issues du métabolisme des VLDL,
- les lipoprotéines à faible densité (Low Density Lipoprotein : LDL) qui sont comme les IDL d'origine vasculaire issues du métabolisme des VLDL,
- les lipoprotéines à forte densité (High Density Lipoprotein : HDL) d'origine hépatique et vasculaire.

Chez les mammifères, après absorption intestinale, les caroténoïdes sont assemblés dans les chylomicrons pour être délivrés dans le système sanguin *via* le système lymphatique (Williams et al., 1998). Sachant que le système lymphatique intestinal est très réduit chez les oiseaux, il semble que les caroténoïdes et leurs métabolites sont incorporés dans les portomicrons, puis ils rejoignent directement le foie *via* le système porte pour être par la suite délivrés dans le système sanguin (Surai, 2002). Cependant, les événements cellulaires régulant l'incorporation des caroténoïdes dans les portomicrons sont jusqu'à présent mal connus. Dans les capillaires des tissus extrahépatiques, les portomicrons peuvent être hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL), enzyme responsable de l'hydrolyse des triglycérides contenus dans les VLDL et les portomicrons. Ces hydrolyses sont probablement

accompagnées d'un transfert ultérieur de certains caroténoïdes aux tissus périphériques et aux autres lipoprotéines. Surai (2002) a rapporté que chez les oiseaux, les portomicrons peuvent subir des modifications hépatiques mineures conduisant à leur libération intégrale au niveau sanguin. Durant leur transport dans la circulation sanguine, les portomicrons sont catabolisés par la lipoprotéine lipase avec une diminution des triglycérides dans le noyau et la création d'un excès de surface contenant une portion de caroténoïde qui est transférée par la suite aux HDL. Par ailleurs, des échanges de caroténoïdes entre les différentes lipoprotéines circulantes peuvent aussi avoir lieu dans le sang (Surai, 2002). Les portomicrons remnants issus des portomicrons sous l'action de la lipoprotéine lipase dans le sang sont captés par le foie. Au niveau hépatique, les caroténoïdes sont incorporés dans les VLDL pour être délivrés par la suite aux différents tissus chez les poulets de type chair ou essentiellement au jaune d'œuf chez les poules pondeuses (Surai, 2002). Cependant, les processus et les facteurs impliqués dans le transfert et l'accumulation des caroténoïdes dans les tissus aviaires et le jaune d'œuf restent toujours méconnus.

La séparation des différents types de lipoprotéines par ultracentrifugation ainsi que leur quantification par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ont permis de déterminer la distribution des différents caroténoïdes associés aux diverses lipoprotéines. Ainsi, les xanthophylles tels que la lutéine et la zéaxanthine sont associés et transportés essentiellement par les HDL (Wang et al., 2007a ; 2007b ; Wang et al., 2010b). Ces dernières représentent la forme la plus répandue des lipoprotéines chez l'espèce aviaire, en particulier chez le poulet (Attie et al., 2002 ; Wang et al., 2010). D'ailleurs, une mutation au niveau du gène codant pour la protéine ATP-binding cassette transporter (ABCA1) régulatrice des niveaux circulants en HDL entraîne une diminution importante des niveaux circulants en lutéine et en zéaxanthine (Attie et al., 2002). De même, chez des poussins à l'éclosion, Surai et al. (2001) ont démontré que la majeure partie (91 %) de la lutéine et de la zéaxanthine, est retrouvée dans les HDL et que seulement des faibles quantités de ces caroténoïdes sont associées à d'autres lipoprotéines. Chez les poussins de type chair, les HDL sont les principaux transporteurs des caroténoïdes dans le plasma, et l'apo-lipoprotéine A-I constitue le site de liaison de ces micronutriments (Allen, 1987). Par contre, chez les poules pondeuses, les VLDL sont les lipoprotéines majeures présentes au cours de la formation des œufs. Il serait donc probable que les caroténoïdes soient associés à ces lipoprotéines (Surai, 2002).

Chez les mammifères, les caroténoïdes apolaires comme le β -carotène et le lycopène sont quant à eux associés et transportés principalement par les VLDL et les LDL (Parker, 1996).

L'ensemble de ces données suggèrent donc que les lipoprotéines joueraient des rôles importants dans le métabolisme des caroténoïdes surtout au cours de la translocation de ces micronutriments du sang vers le foie et les tissus périphériques comme la rétine, les reins, le tissu adipeux et le muscle. Par ailleurs, les caroténoïdes protègent les lipoprotéines contre les oxydations par les radicaux libres dérivés des réactions de conversion des acides gras polyinsaturés en peroxydes lipidiques (Bhosale et Bernstein, 2007).

II.3. Distribution tissulaire des caroténoïdes

Les concentrations en caroténoïdes sont très variables d'un tissu à l'autre quelle que soit l'espèce étudiée. Le foie constitue la principale réserve de caroténoïdes chez les espèces aviaires (Surai, 2002 ; Karadas et al., 2005b). Il apparaît que cet organe joue un rôle primordial dans la disponibilité des caroténoïdes pour les divers tissus. En effet, le foie régule divers processus biologiques impliqués dans le métabolisme des caroténoïdes comme le recyclage biliaire, la conversion des caroténoïdes provitamines A en vitamine A, le stockage des différentes formes de la vitamine A, la mobilisation des réserves en caroténoïdes ou encore leur sécrétion associés aux lipoprotéines hépatiques (VLDL, HDL). Néanmoins, d'autres organes peuvent présenter des concentrations importantes en caroténoïdes, notamment la rétine, le cœur, la peau, le tissu adipeux et le muscle squelettique (Surai et al., 2001; Wang et al., 2010b; Le Bihan-Duval et al., 2011). Chez les volailles, cette distribution tissulaire en caroténoïdes peut varier en fonction de l'espèce et du mode production (Karadas et al., 2005b).

Chez les mammifères, Borel et al. (2005) ont rapporté que les tissus riches en récepteurs LDL comme le foie contiennent des quantités importantes de caroténoïdes. Cependant, ces micronutriments liposolubles ont également été retrouvés dans de nombreux tissus ou organes, notamment dans la rétine, la peau, les reins, le cœur et le tissu adipeux (Surai et al., 2001 ; Karadas et al., 2005b). Il semble donc que la distribution tissulaire des caroténoïdes soit en rapport direct avec leurs rôles biologiques dans les divers tissus. Cette variabilité de

distribution tissulaire laisse supposer l'existence de mécanismes de régulation spécifiques d'un tissu à un autre.

Les xanthophylles sont les principaux caroténoïdes accumulés dans les tissus chez les espèces aviaires (Surai, 2002). Néanmoins, certains oiseaux sauvages peuvent stocker des quantités importantes de β -carotène dans leurs tissus surtout au niveau du foie qui peuvent atteindre 37 à 58 % des caroténoïdes hépatiques (Surai et al. 2001). Chez l'homme, les carotènes constituent les caroténoïdes les plus accumulés, principalement dans le tissu adipeux (environ 80 % des caroténoïdes totaux) et le foie (10 %) (Chung et al., 2009). En comparaison avec les mammifères, Surai (2002) a suggéré que les oiseaux sont de meilleurs absorbeurs et accumulateurs des xanthophylles, notamment de lutéine et de zéaxanthine. Par contre, les mammifères y compris l'homme accumulent mieux les carotènes, en particulier le β -carotène et le lycopène, pouvant suggérer ainsi des mécanismes différents dans le métabolisme des caroténoïdes entre les différentes espèces.

Les teneurs des tissus en caroténoïdes ne varient pas uniquement en fonction du type de caroténoïdes (carotènes ou xanthophylles). Ils varient aussi en fonction de leurs teneurs dans les aliments distribués aux animaux. La lutéine représente le caroténoïde le plus répandu dans les aliments destinés aux volailles. C'est aussi le caroténoïde le plus présent dans les tissus aviaires suivi par la zéaxanthine (Surai, 2002). Des supplémentations en lutéine ou en canthaxanthine augmentent significativement les teneurs de ces caroténoïdes dans le plasma et dans le foie chez le poulet (Haq et al., 1995). En revanche, une supplémentation avec du β -carotène induit une augmentation de ce caroténoïde uniquement dans le plasma, suggérant ainsi soit un catabolisme important du β -carotène au niveau intestinal en particulier au niveau du duodénum où l'enzyme BCMO1, spécifique du clivage central de ce caroténoïde, est très active (Wyss et al., 2001), ou bien un déplacement faible de ce caroténoïde du sang vers les tissus.

Chez les poules pondeuses, Na et al. (2004) ont démontré que les caroténoïdes les plus polaires comme la canthaxanthine sont mieux absorbés au niveau intestinal par rapport aux caroténoïdes les moins polaires comme le β -carotène. En revanche, les caroténoïdes plus polaires sont moins bien transférés du sang vers les tissus périphériques, à l'opposé du β -carotène (moins polaire) dont le déplacement vers la peau est particulièrement efficace. Outre

ces résultats, Wang et al. (2010b) n'ont pas détecté de β -carotène dans de nombreux tissus, à l'exception du foie, même avec des doses fortes allant de 27 mg jusqu'au 227 mg/kg d'aliment. Un tel résultat serait peut-être dû à un clivage important ou une faible absorption de ce caroténoïde au niveau intestinal sachant que la bile du poulet ne contient pas ou peu de β -carotène. Cependant, elle est riche en lutéine et zéaxanthine (Surai et al., 2001). Il semble que le β -carotène est majoritairement exclus de la physiologie des volailles à l'exception d'être fourni comme substrat pour la synthèse de la vitamine A au niveau de l'intestin des poussins.

III. Régulation moléculaire du métabolisme des caroténoïdes

Comme mentionné précédemment, plusieurs enzymes et protéines sont impliquées dans le métabolisme des caroténoïdes. Elles agissent au niveau de :

- leur absorption : SR-BI, CD36, ABCA ;
- leur conversion : BCMO1, BCMO2 ;
- leur absorption et leur conversion : ISX.

III.1. Scavenger receptor class B type I (SR-BI)

SR-BI est une glycoprotéine membranaire, codée par le gène SCARB1, possédant une masse moléculaire de 80 à 82 kDa. Elle a été identifiée chez plusieurs espèces, dont l'homme et le poulet. Chez les mammifères, elle est exprimée dans divers tissus tels que le foie, le cœur, les reins, le tissu adipeux et l'intestin grêle (Lobo et al., 2001 ; Duggan et al., 2002 ; van Bennekum et al., 2005). La protéine SR-BI a été d'abord identifiée comme étant spécifique de l'absorption du cholestérol au niveau intestinal et hépatique. Elle joue le rôle de récepteur pour les lipoprotéines à haute densité (HDL) dans le foie régulant les taux sanguins de cholestérol lié aux HDL (Terpstra et al., 2000). Ainsi, le gène codant la protéine SR-BI (SCARB1) est fortement exprimé dans le foie (Rigotti, 2004; Leiva et al., 2011), organe où des quantités importantes de cholestérol sont absorbées.

Des études récentes ont suggéré que la protéine SR-BI est aussi impliquée dans l'absorption intestinale de la lutéine (Reboul et al., 2005), du β -carotène (van Bennekum et al., 2005), de la

zéaxanthine (During et al., 2008) et du lycopène (Moussa et al., 2008). Elle participe aussi à l'absorption sélective des caroténoïdes par l'épithélium pigmentaire de la rétine (During et al., 2008).

Le rôle du SR-BI ne se limite pas uniquement aux caroténoïdes car il a été observé que cette protéine est également impliquée dans le métabolisme de certaines vitamines telles que la vitamine A (During et Harrison, 2007 ; Harrison, 2011), la vitamine E (Reboul et al., 2006), la vitamine D (Reboul et al., 2011), et du cholestérol (Rigotti et al., 2003 ; Leiva et al., 2011). Chez la souris, une surexpression de SR-BI induit une augmentation de la biodisponibilité de la vitamine E, en particulier du gamma-tocophérol dans l'intestin (Reboul et al., 2006). En revanche, l'utilisation d'anticorps anti-SR-BI ou d'inhibiteurs chimiques comme l'anti-cholestérol « ezetimibe » bloquant la protéine SR-BI engendre une diminution importante (- 80 %) de l'absorption intestinale de la vitamine E (Reboul et al., 2006).

III.2. Cluster déterminant 36 (CD36)

C'est une glycoprotéine qui appartient à la famille des récepteurs scavengers de classe B, possédant une taille de 88 kDa. Chez les mammifères, elle est principalement exprimée dans les cellules épithéliales et les adipocytes (Terpstra et al., 2000), mais aussi dans le duodénum et le jéjunum (Lobo et al., 2001). Au niveau intestinal, sa distribution est complémentaire à celle de la protéine SR-BI. Elle est faiblement exprimée dans le duodénum et fortement exprimée dans le jéjunum et l'iléon (van Bennekum et al., 2005).

A l'origine, CD36 a été identifiée comme acteur principal, facilitant le transport des acides gras à chaîne longue dans les adipocytes et les cellules musculaires. En effet, des souris KO pour le gène CD36 présentent une absorption réduite d'acides gras au niveau du tissu adipeux (Coburn et al., 2000), suggérant un rôle actif pour CD36 dans l'absorption des acides gras par le tissu adipeux. Sachant que les caroténoïdes présentent plusieurs caractéristiques communes avec les lipides, des études récentes ont pu démontrer que CD36 comme SR-BI est impliquée dans l'absorption du β -carotène par les cellules intestinales (van Bennekum et al., 2005). De même, During et al. (2005) ont montré que l'utilisation d'anticorps dirigés contre la protéine CD36 induit une inhibition du transport du β -carotène chez les cellules intestinales humaines Caco-2 différenciées. Le rôle important que joue la protéine CD36 dans l'absorption cellulaire

des caroténoïdes a été confirmé récemment chez la souris par l'utilisation d'adipocytes (3T3-L1) et du tissu adipeux (Moussa et al., 2011), suggérant ainsi un rôle primordial de cette protéine dans l'absorption cellulaire des caroténoïdes (lutéine et lycopène notamment). CD36 comme SR-BI peut interagir avec une large variété de ligands comme certaines lipoprotéines (HDL, LDL et VLDL), les acides gras, le cholestérol libre (Terpstra et al., 2000), ainsi que plusieurs caroténoïdes tels que la lutéine et le lycopène (Moussa et al., 2011).

III.3. Les transporteurs ABC

Les transporteurs ABC appelés aussi « ATP-binding cassette transporters » forment un vaste ensemble de protéines membranaires capables de transporter une large gamme de substances biologique comme les lipides, les acides aminés, les protéines, les peptides, le cholestérol et les sels biliaires (Dean et al., 2001 ; Borel, 2011) en utilisant de l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP (Dean et al., 2001 ; Moody et al., 2002). Parmi ces protéines, l'ATP-binding cassette transporters sous-famille A membre 1 (ABCA1) a été identifiée comme médiateur des efflux du cholestérol (Mulligan et al., 2003 ; Harrison, 2011) et des tocophérols (Oram et al., 2001 ; Reboul et al., 2009) chez les mammifères. Elle est principalement localisée au niveau du site basolatéral de l'entérocyte chez la souris (Wellington et al., 2002). Par ailleurs, chez le poulet, une mutation au niveau du gène codant pour cette protéine (ABCA1) se traduit par une diminution importante des niveaux circulants en HDL et par conséquent des niveaux plasmatiques en lutéine et en zéaxanthine (Attie et al., 2002 ; Wang et al., 2007a). Il semble aussi que l'ATP-binding cassette sous-famille G membre 5 (ABCG5) soit l'un des transporteurs ABC assurant l'efflux des caroténoïdes, surtout ceux les plus polaires comme la lutéine et la zéaxanthine, de l'intestin vers la lumière intestinale (Kotake-Nara et Nagao, 2011). Il est possible aussi que l'ABCA1 puisse jouer un rôle important dans le transport du rétinol à travers les membranes cellulaires (Harrison, 2011). Néanmoins, la détermination des mécanismes exacts impliqués dans l'absorption de tous ces micronutriments par les différentes cellules *via* ABCA1 reste toujours très compliquée du fait que des mécanismes multiples (passif et facilité) et des facteurs de variation d'origines diverses peuvent co-exister dans la même cellule.

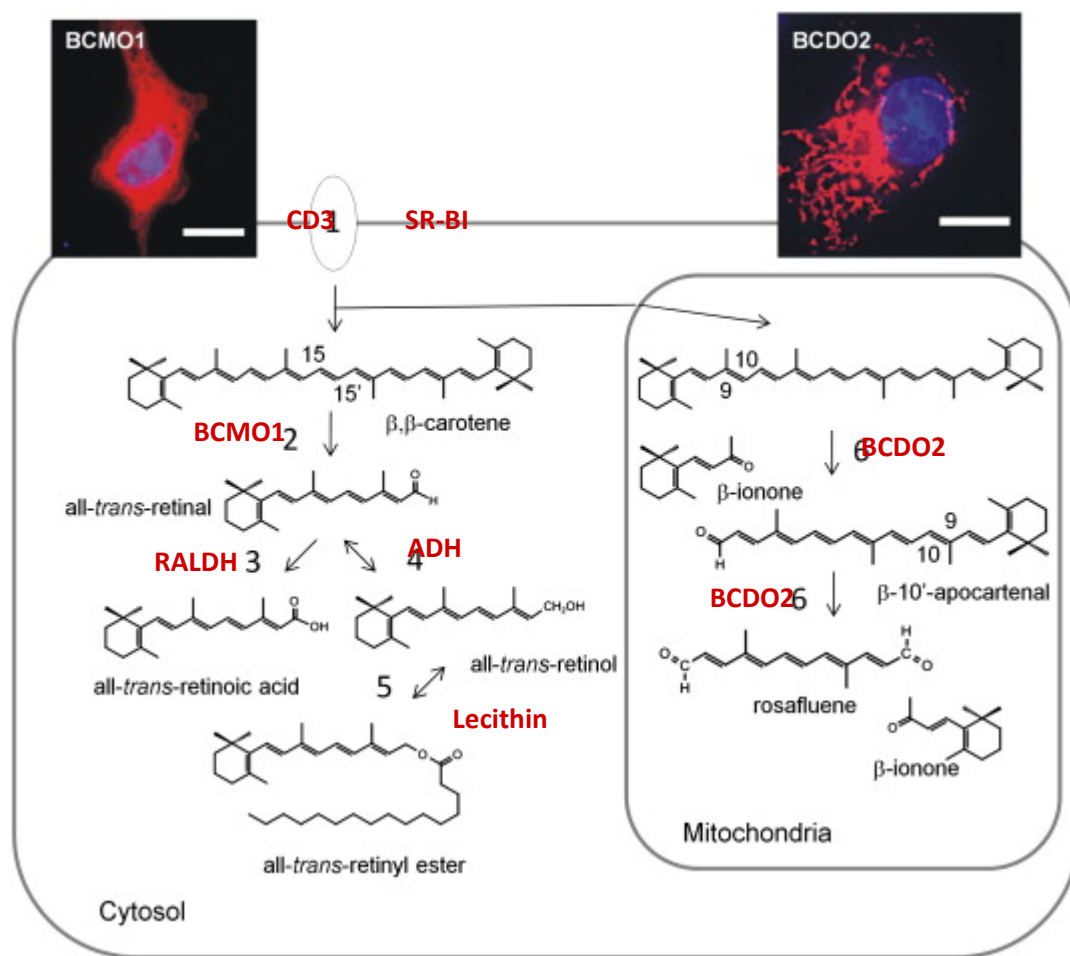


Figure 19. Clivage du β -carotène (D'après Lobo et al., 2012).

Il existe 2 types de clivage : le clivage symétrique catalysé par l'enzyme cytoplasmique β,β -carotène-15,15'-monooxygénase 1 (BCMO1) et le clivage asymétrique catalysé par l'enzyme mitochondriale β,β -carotène-9',10'-diooxygénase 2 (BCDO2). SR-BI : scavenger receptor B type I ; CD36 : cluster déterminant 36; RALDH : retinal deshydrogénase; ADH : alcool déshydrogénase

Tableau 11 : Les différentes caractéristiques biochimiques de l'enzyme BCMO1 chez plusieurs espèces (D'après Lietz et al., 2010).

	Homme (recombinant)	Poulet (recombinant)	Porc	Rat	Souris
Poids moléculaire (kDa)	64	240	100-200	100-200	63
pH optimal (à 37°C)	7,5-8,0	8,0	7,8-8,2	7,7	
Km ($\mu\text{mol/l}$)	6-31	26	1,3-5,6	0,52-5,91	6
Vmax (nmol retinal/mg protein x h)	66-420		1,6-0,01	0,099-1,19	2,16

III.4. β , β -carotène 15,15'-monoxygénase 1 (BCMO1)

Anciennement appelée β , β -carotène 15,15'-dioxygénase (BCDO), BCMO1 est une enzyme clé catalysant la conversion des caroténoïdes provitamines A en vitamine A. Elle agit au niveau des doubles liaisons 15,15' d'une molécule du β -carotène formant ainsi deux molécules de rétinol (Figure 19). Elle est isolée par Goodman et Huang (1965), mais elle n'est purifiée et clonée pour la première fois chez les vertébrés qu'en 2000 par Wyss et al. (2000). Ces auteurs ont montré que BCMO1 est une enzyme cytoplasmique codée par le gène BCMO1 avec une longueur de 3,1 kb codant pour une protéine possédant un poids moléculaire de 60,3 kDa (Leuenberger et al., 2001 ; Wyss, 2004). Cependant, d'autres études ont rapporté que certaines propriétés biochimiques de l'enzyme BCMO1 varient suivant l'espèce étudiée (Tableau 11).

Le gène BCMO1 est localisé sur le chromosome 11 chez le poulet (Le Bihan-Duval et al., 2011) alors que chez la souris il se situe sur le chromosome 8 (Boulanger et al., 2003). Il code pour l'enzyme BCMO1 qui a été caractérisée chez plusieurs espèces telles que l'homme (Yan et al., 2001), la drosophile (von Lintig et Vogt, 2000) et la souris (Redmond et al., 2001). La combinaison des techniques biochimiques et de biologie moléculaire a permis d'établir le profil d'expression du gène BCMO1 chez plusieurs espèces en particulier chez la souris, le rat et le poulet. Chez la souris, BCMO1 est fortement exprimé dans le foie, le duodénum, les testicules, l'iléon et les reins (Redmond et al., 2001 ; Wyss, 2004). Par contre, chez le poulet, BCMO1 est fortement exprimé dans le duodénum, les poumons, le foie et faiblement exprimé dans l'iléon (Wyss et al., 2001 ; Wyss, 2004). Chez cette espèce, l'activité enzymatique de BCMO1 n'a pas été détectée dans le duodénum durant la vie embryonnaire, mais elle augmente rapidement après éclosion (Tajima et al., 2001 ; Yamaguchi et al., 2007). Ces derniers auteurs ont rapporté que l'enzyme BCMO1 possède une faible affinité pour le β -carotène dans le duodénum par rapport à celle dans le foie. Plusieurs études ont montré que le gène BCMO1 est faiblement ou non exprimé au niveau du muscle squelettique (Wyss et al., 2001 ; Lindqvist et Andersson, 2002). Une récente étude a pourtant montré que ce gène est bien exprimé au niveau du muscle squelettique chez le poulet et que son expression varie même en fonction de l'âge (Le Bihan-Duval et al., 2011).

III.5. β , β -carotène 9',10'-dioxygénase 2 (BCDO2)

L'enzyme BCDO2 est aussi appelée β , β -carotène 9',10'-monooxygénase (BCMO2) ou caroténoïdes oxygénase (CO2). Ses propriétés biochimiques ont été moins étudiées que celles de BCMO1. L'enzyme BCDO2 a été clonée et caractérisée chez les mammifères pour la première fois par Kiefer et al. (2001). Ces auteurs ont rapporté que BCDO2 comme BCMO1 contient des ions Fe^{2+} et présente une localisation cytoplasmique. Cependant, une étude récente a démontré que BCDO2 est en fait localisée au niveau mitochondrial contrairement à BCMO1 qui est présent dans le cytoplasme (Mein et al., 2011).

Chez la souris, BCDO2 est exprimé dans l'intestin grêle, le foie, les reins, la rate, le cerveau et le cœur (Kiefer et al., 2001). Une distribution similaire a été observée aussi chez le furet (Hu et al., 2006). Chez le poulet, BCDO2 est exprimé à la fois dans le foie et la peau (Ericksson et al., 2008). Durant plusieurs années, BCDO2 a été considérée comme enzyme spécifique assurant uniquement le clivage asymétrique du β -carotène au niveau de ses doubles liaisons 8', 10', 12' ou 14' (Olson, 1989 ; Kiefer et al., 2001 ; von Linting et Wyss, 2001) produisant des apo-caroténals. Cependant, Mein et al. (2011) ont démontré que cette enzyme clive aussi la β -cryptoxanthine, la lutéine et la zéaxanthine en apo-caroténals et en β -ionone. Cependant, ce clivage par BCDO2 a été observé uniquement chez le furet au niveau des cellules transfectées et clonées, et pas chez d'autres espèces.

III.6. Intestine specific homeobox (ISX)

C'est une protéine possédant une taille de 27 kDa, agissant comme facteur de transcription spécifique dans l'intestin. Elle participe à la régulation des caroténoïdes, de la vitamine A et des lipides *via* le contrôle conjoint de l'expression des gènes BCMO1 et SR-BI (Seino et al., 2008 ; Lobo et al., 2010 ; von Lintig, 2010 ; Figure 20). Récemment, elle a été identifiée comme répresseur présumé de l'expression de SR-BI dans l'intestin (Choi et al., 2006), régulant ainsi l'absorption intestinale des caroténoïdes (Lietz et al., 2010 ; Lobo et al., 2010). Chez la souris, le gène codant pour ISX est exprimé d'une manière croissante en allant du duodénum à l'iléon (Choi et al., 2006). Des souris dont le gène ISX est invalidé ($\text{ISX}^{-/-}$) présentent des expressions élevées à la fois des gènes BCMO1 et SR-BI (Choi et al., 2006 ; Seino et al., 2008) avec un gradient d'expression opposé à celui d'ISX (Mardones et al.,

2001 ; Bachmann et al., 2002). Par ailleurs, l'expression du gène ISX est régulée en amont par l'acide rétinoïque, dérivé du clivage du β -carotène par l'enzyme BCMO1. En effet, dans l'intestin, l'acide rétinoïque induit une augmentation de l'expression d'ISX qui réprime en aval l'expression du SR-BI induisant une diminution de l'absorption des caroténoïdes et des lipides alimentaires (Lobo et al., 2010, Lietz et al., 2010).

Il existe d'autres gènes qui régulent l'expression du gène BCMO1 en agissant comme facteurs de transcription. Chez le rat, un élément de réponse pour le PPAR γ (PPARE) a été mis en évidence au niveau du promoteur du gène BCMO1 dont la délétion provoque une suppression de l'expression du gène BCMO1 (Boulanger et al., 2003).

IV. Facteurs régulateurs du métabolisme des caroténoïdes

IV.1. Facteurs alimentaires

De nombreux facteurs alimentaires peuvent influencer le métabolisme des caroténoïdes en agissant au niveau de :

- la libération des caroténoïdes de leur matrice alimentaire,
- la solubilisation des caroténoïdes dans la phase lipidique,
- l'incorporation des caroténoïdes dans les micelles mixtes,
- l'absorption (passive/transporteurs) des caroténoïdes par les entérocytes,
- le transport, la conversion et l'accumulation des caroténoïdes dans l'intestin, le foie et les tissus périphériques.

IV.1.1. La nature des caroténoïdes alimentaires

En général, l'absorption des caroténoïdes varie en fonction de leur nature, autrement dit, de leurs appartenances aux carotènes ou aux xanthophylles (Parker, 1996 ; Kotake-Nara et Nagao, 2011). Au sein de la même classe, il semble qu'il n'existe pas de différence d'absorption intestinale comme par exemple entre l' α -carotène et le β -carotène. Par contre, les xanthophylles sont relativement mieux assimilables au niveau intestinal que les carotènes surtout chez les volailles (Surai, 2002 ; Na et al., 2004). Il semble aussi, que le degré de

polarité d'un caroténoïde constitue un facteur clé dans l'absorption intestinale et l'assimilation tissulaire des caroténoïdes (Na et al., 2004).

La nature d'un caroténoïde ne détermine pas uniquement son seuil d'incorporation dans les micelles mixtes, son absorption et sa conversion dans l'intestin, mais aussi sa localisation au sein des lipoprotéines et sa conversion ou son accumulation dans les différents tissus. Surai et Speake (1998) ont rapporté qu'il existe des différences au niveau de l'absorption et de l'accumulation tissulaire des caroténoïdes, et que le devenir d'un caroténoïde après son ingestion est fortement déterminé par le type de pigment (carotène ou xanthophylle).

IV.1.2. Caroténoïdes et autres micronutriments liposolubles présents dans la ration alimentaire

De nombreuses études ont montré que les caroténoïdes peuvent entrer en compétition au cours des processus d'absorption intestinale, de transfert et d'accumulation. Ainsi, Wang et al. (2010b) ont montré qu'il existe une compétition entre la lutéine, la zéaxanthine et le β -carotène lorsque ces micronutriments sont présents à forte dose dans les aliments destinés aux poulets. Cependant, le degré de compétition entre les caroténoïdes varie d'un caroténoïde à un autre (carotène ou xanthophylle) et selon la matrice alimentaire dans laquelle il est incorporé (Vishwanathan et al., 2010). Ainsi, chez l'homme, l'augmentation de la consommation de lutéine et de zéaxanthine d'origine vitelline (jaune d'œuf) n'a pas d'effet sur l'absorption et le transfert des autres caroténoïdes. En revanche, l'ingestion de lutéine avec du β -carotène peut entraîner une diminution de l'absorption intestinale de la lutéine (Mamatha et Baskaran, 2011). Diverses interactions peuvent intervenir entre les différents caroténoïdes, à savoir une compétition entre le β -carotène et la lutéine, la zéaxanthine ou la canthaxanthine au cours de leur solubilisation dans les micelles mixtes et leur absorption intestinale.

Globalement, le phénomène de compétition entre les caroténoïdes peut être expliqué par :

- la compétition existante entre les caroténoïdes au moment de leur incorporation dans les micelles mixtes afin d'être absorbés,
- la compétition des caroténoïdes au niveau des transporteurs membranaires tels que SR-BI, CD36, et ABC.

Les xanthophylles comme la lutéine, la zéaxanthine et la canthaxanthine pourraient ainsi entrer en compétition avec le β -carotène pour être solubilisés dans les micelles mixtes ou absorbés par les cellules intestinales (Grolier et al., 1997 ; van den Berg et van Vliet, 1998). Ils peuvent aussi réguler l'activité de conversion de BCMO1. Ainsi, des études *in vitro* ont montré que la conversion du β -carotène est inhibée par l'addition de canthaxanthine ou de zéaxanthine (Grolier et al., 1997). La canthaxanthine pourrait réguler BCMO1 en inhibant une enzyme qui assure la conversion du rétinol en forme de stockage estérifiée (Lietz et al., 2010) ou en stimulant le catabolisme de la vitamine A en acide rétinoïque régulateur crucial du gène BCMO1 (Grolier et al., 1997). Zaripheh et al. (2006) ont démontré que le lycopène induit une sous-expression du gène BCMO1 au niveau des reins et de la glande surrénale, inhibant ainsi le catabolisme du β -carotène. Certains métabolites issus du clivage asymétrique du β -carotène comme l'apo-8'-caroténal et l'apo-12'-caroténal peuvent aussi affecter l'activité enzymatique de BCMO1 et donc la conversion du β -carotène (Bachmann et al., 2002) *via* semble t'il les récepteurs de l'acide rétinoïque (RARs), en particulier par le récepteur RAR α .

Les caroténoïdes étant généralement consommés avec d'autres micronutriments, de nombreuses études ont démontré que le métabolisme des caroténoïdes peut aussi être affecté par ces micronutriments notamment ceux qui sont liposolubles. Dans ce sens, Hageman et al. (1999) ont démontré que la vitamine E diminue l'absorption intestinale de la canthaxanthine chez le rat. Par contre, Nierenberg et al. (1994) ont rapporté qu'une supplémentation en vitamine E associée à de l'acide ascorbique n'altère pas les niveaux plasmatiques en β -carotène. Par ailleurs, en présence d' α -tocophérol, le β -carotène est converti exclusivement en rétinol suite à l'activation de l'enzyme BCMO1 alors qu'en absence de ce micronutriment, les produits des clivages symétriques et asymétriques ont été identifiés, montrant une activation des deux enzymes responsables du clivage symétrique (BCMO1) et asymétrique (BCDO2) du β -carotène (Yeum et al., 2000).

IV.1.3. Le statut en vitamine A

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que la vitamine A inhibe l'absorption et la conversion des caroténoïdes aux niveaux intestinal et hépatique. Ainsi, selon van Vliet et al. (1996), l'activité de clivage du β -carotène est deux fois plus importante dans l'intestin de rats déficients en vitamine A par rapport à des rats recevant des doses élevées en vitamine A. Par

Tableau 12: Effets de la vitamine A sur l'expression génique ou l'activité enzymatique de BCMO1.

Caroténoïdes/rétinoïdes	Espèce	Expression ou activité de BCMO1	Références
<i>Activité intestinale</i>			
Acide tout-trans-rétinoïque	Poulet	↓	(1)
Acide tout-trans-rétinoïque	Rat	↓	(1)
Acide 9-cis-rétinoïque	Rat	↓	(1)
Acide 13-cis-rétinoïque	Rat	NS	(1)
Acétate de rétinyle	Rat	↓	(1)
<i>Expression génique</i>			
Acide tout-trans-rétinoïque	Poulet (foie)	↓	(1)
Acide tout-trans-rétinoïque	Rat		
	Foie	↓	
	Poumons	↓	(2)
	Testicules	↓	
	Rein	NS	
Acide 9-cis-rétinoïque	Rat		
	Foie	NS	
	Poumons	↓	(2)
	Testicules	↓	
	Rein	NS	

↓ : diminue l'expression ou l'activité ; NS : effet non significatif

(1) Bachmann et al., 2002 ; (2) Takitani et al., 2006.

contre, la concentration en vitamine A du régime n'affecte pas l'activité de conversion du β -carotène dans le foie. En revanche, cette dernière est augmentée par l'apport de β -carotène. De plus, une corrélation positive existe entre les quantités en vitamine A stockées dans le foie sous forme d'ester de rétinyl et l'activité intestinale du clivage du β -carotène (van Vliet et al., 1996).

Chez l'humain, il est aussi établi que l'efficacité de conversion du β -carotène en rétinol dépend étroitement du statut de l'aliment en vitamine A (Ribaya-Mercado et al., 2000). Selon Lietz et al. (2010), la vitamine A constitue l'un des facteurs alimentaires les plus importants qui influencent l'activité de BCMO1. Ces effets de la vitamine A peuvent être expliqués par le fait que l'acide rétinoïque issu du métabolisme de la vitamine A contrôle l'expression des messagers de BCMO1 par un rétro-contrôle négatif *via* les récepteurs RAR et RXR (Bachmann et al., 2002 ; Takitani et al., 2006). Ainsi, plusieurs études ont rapporté que l'acide rétinoïque qui est dérivé du clivage des procaroténoïdes peut contrôler plus de 500 gènes (Balmer et Blomhoff, 2002). Cependant, les effets de la vitamine A sur l'activité ou l'expression du BCMO1 varient en fonction de la forme de la vitamine A (acide ou ester), de la configuration *cis* ou *trans* de l'acide rétinoïque et du tissu étudié (Tableau 12).

Il a été démontré récemment qu'il existe au niveau intestinal un régulateur de l'absorption du β -carotène et de la production de la vitamine A nommé ISX décrit précédemment et dont l'expression est activée par l'acide rétinoïque *via* le récepteur RAR qui se lie à son élément de réponse spécifique localisé au niveau du promoteur du gène ISX (Lobo et al., 2010). Une fois, ce dernier activé, il réprime l'expression des deux gènes codant pour SR-BI et BCMO1, largement impliqués dans l'absorption et le clivage (production de la vitamine A) du β -carotène, respectivement. Ceci indique donc que l'absorption et le clivage des caroténoïdes au niveau intestinal sont en partie sous contrôle négatif à travers l'induction de l'expression d'ISX par l'acide rétinoïque (Lietz et al., 2010). Selon ce dernier auteur, le paradoxe de relations observées entre le statut en vitamine A et le clivage du β -carotène dans l'intestin et le foie peut être lié au fait que l'expression de BCMO1 dans le foie contrairement à celle de l'intestin n'est pas altérée par la surexpression d'ISX. De même, l'acide rétinoïque inhibe SR-BI *via* ISX dans le duodénum et le jéjunum, mais cet effet n'apparaît pas au niveau du foie à cause de l'absence de ce facteur de transcription (Lobo et al., 2010) indiquant que l'effet

inhibiteur d'ISX sur l'expression des gènes cibles varie en fonction des types cellulaires (entérocytes, hépatocytes).

IV.1.4. Les lipides alimentaires

Il est bien établi que les lipides alimentaires affectent le métabolisme des caroténoïdes en facilitant leur assimilation dans les micelles mixtes, leur absorption et leur conversion dans les tissus. Ainsi, la présence des lipides dans la ration favorise la sécrétion des sels biliaires qui augmentent la quantité des micelles mixtes, améliorant ainsi la solubilisation des caroténoïdes (Hofmann, 1963). Chez l'homme, une quantité de triglycérides de 3 à 5 g par repas est suffisante pour une meilleure absorption du β -carotène (van het Hof et al., 2000). Par contre, les esters de lutéine sont plus assimilés en présence d'une quantité plus élevée de triglycérides (de l'ordre de 36 g) dans le repas (Roodenburg et al., 2000). Par ailleurs, le processus d'incorporation des caroténoïdes dans les micelles mixtes peut être affecté par la longueur des acides gras dans la ration mais pas par le nombre des doubles liaisons pour les acides gras insaturés (Huo et al., 2007).

Les lipides alimentaires influencent aussi la conversion des caroténoïdes, surtout ceux possédant des activités provitaminiques A. Une quantité suffisante en matière grasse entraîne une augmentation de la conversion du β -carotène dans le foie, induisant une augmentation des teneurs hépatiques en vitamine A (Deming et al., 2000). De même, Lakshman et al. (1996) ont observé une augmentation significative des niveaux tissulaires des différentes formes de vitamine A dans le foie, les poumons, les reins, le tissu adipeux et les testicules de furets nourris avec un aliment contenant 23% de matière grasse (MG) comparé à ceux nourris avec seulement 6% de MG. Récemment, une étude menée chez le rat a montré que l'huile et les phospholipides de soja augmentent aussi l'absorption de la lutéine (Mamatha et Baskaran, 2011).

IV.1.5. Les protéines alimentaires

Les effets des protéines alimentaires sur le métabolisme des caroténoïdes sont encore peu étudiés. Des rats nourris avec un régime déficient en protéines présentent une faible activité enzymatique de clivage du β -carotène au niveau intestinal (Parvin et Sivakumar, 2000). De

même, Hosotani et Kitagawa (2005) ont montré que l'activité intestinale de l'enzyme BCMO1 chez des rats est 2,8 fois supérieure avec un régime contenant 20 % de protéines en comparaison à un régime en contenant 5 %. Cependant, l'activité de BCMO1 n'est pas influencée uniquement par la quantité des protéines, mais aussi par la qualité des protéines présentes dans le régime alimentaire. Ainsi, des rats nourris avec des caséines stockent plus de vitamine A dans le foie par rapport à ceux nourris avec du gluten ou de la lactalbumine (James et Elgindi, 1953).

IV.1.6. Les fibres alimentaires

Les fibres alimentaires affectent le métabolisme des caroténoïdes, en agissant sur la formation des micelles mixtes et en inhibant l'activité des enzymes d'origines pancréatiques (lipase et colipase), qui sont responsables de la dégradation des lipides alimentaires et des principaux constituants des émulsions et des micelles mixtes. Les fibres alimentaires diminuent l'absorption intestinale des caroténoïdes (Riedl et al., 1999) en augmentant leur excrétion dans les fèces (Yeum et Russell, 2002 ; Yonekura et Nagao, 2007). Hoffmann et al. (1999) ont démontré qu'une supplémentation des animaux en pectine ou en cellulose diminue les effets antioxydants des caroténoïdes et de l' α -tocophérol suite à une diminution de l'absorption de ces micronutriments dans l'intestin. Les résultats d'une étude récente menée chez le rat alimenté à base de lutéine et de pectine ont aussi mis en évidence l'effet inhibiteur de cette fibre alimentaire sur l'absorption de la lutéine (Mamatha et Baskaran, 2011). Dans le foie, l'effet des fibres alimentaires sur la conversion du β -carotène dépend du type de fibre. La pectine affecte en effet négativement la conversion du β -carotène alors que la gomme d'avoine induit plutôt le phénomène inverse (Deming et al., 2000).

IV. 2. Facteurs génétiques

Les teneurs plasmatiques et tissulaires en caroténoïdes sont modulées non seulement par des facteurs alimentaires, mais aussi génétiques. Récemment, certaines études ont en effet démontré que des mutations chez l'homme ou chez les animaux au niveau des gènes codant pour plusieurs enzymes peuvent moduler les teneurs en caroténoïdes du sang et/ou des tissus.

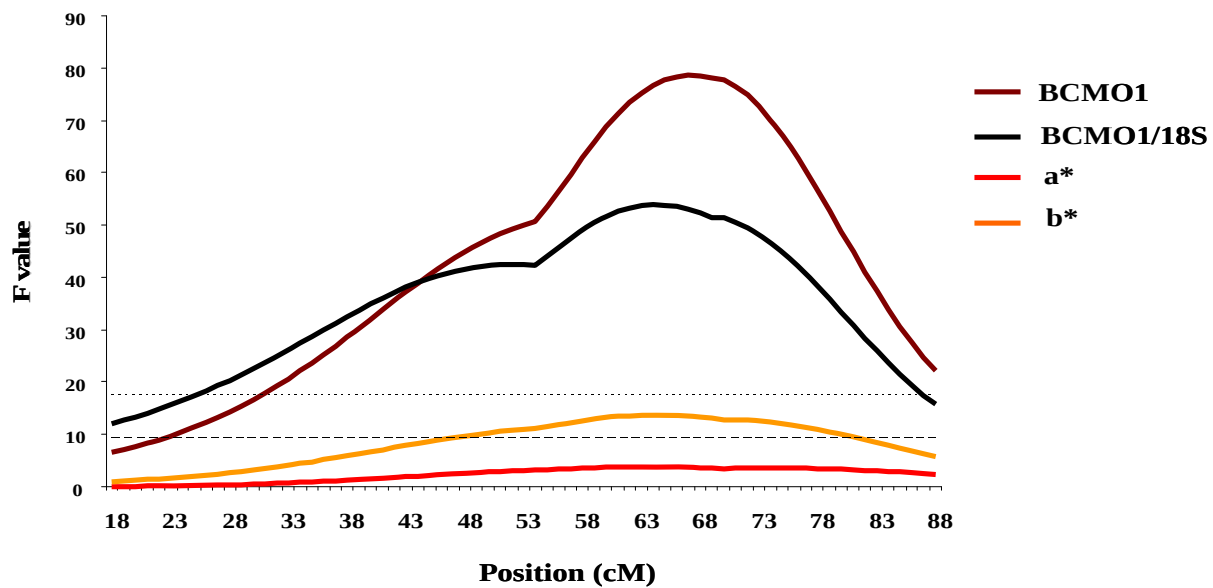


Figure 21. Profils de vraisemblance des QTL pour les valeurs de rouge (a*) et jaune (b*) et des eQTL pour l'expression brute ou relative par rapport au 18S de BCMO1.

(Le Bihan-Duval et al., 2010).

CTCTGCAATCACATGCTTTATATTGAAATAATTCTTTTCCTAGAGGATTTTAAAATTAAC
AACATTGAACTCAGTTAAGTACCTTATCTTGAAAGAAATGCATGAAGTTAAAAATCCCC
TTCTTCTTAATTATTCTCTG/ACCATACTTTTCGCAGAGGCTTCGAGTTGCTGATAACCAGG/ATG
GAATCAGATCACACGTG/AGGAGAATGTAGAATAGTGCCTG/CTTTGTAAAAAGGTGTTTAATT
CAAAGGTGTGCTGCTCAGTTCACTCTGGAAGTCTTGTACCTAAAGAAAAAAGCTCAT
CATTGTTCAGTGCTGATATATTGTGAGTTAATAGAATAGCCCAGGTAAATTTGACTGAT
GACACTCCATCTGTCTATAACT/ACCCAAGAAGACAATTCAGAATGGTGGGTAGAGCTTTCT
CCTGTTTTTCTCCCTGCTCCTGCCAAGTGGGG/ACAGGCACCCCTACCAACAGCTCCGACTT
TCCCTGCAATGCTGAAGGTGATATTTTCAGTTTTCATTTTGCCTTTGGTGTGCCTGGCTGCC
TGAAGTAGCTTCACACAGAGCAAAGAGGTGAGCTATACTTTTCTTACTCTAACATCAAAT
TAGTGAAAGAGTTAAAGGGACGTGCGAGAACTACTGTGTATGTGTTAGGGATTAAAGATC
AACTGTTATAAGTTGTCGATCTATAAGCCAGCAGCCACTAGCTCAAGTTGCACTTTAAC
TCATCCTTCTATGTAACAGGAAAGAGCTGTTCTTAGCCCAGAGAGGGGG/CACCGCTACG
CCTGCAGGAGCAGCTGGGTAGAGGACACAGGAGAGCGATGGAGACAATATTTAACAGAAA
CAAAGAAGAGCATCCAGA

Figure 22. Polymorphismes (SNP) dans le promoteur du gène BCMO1 (-817 à 41 pb)

(D'après Le Bihan-Duval et al., 2011).

Tous les SNP trouvés sont indiqués en rouge. Les deux SNP liés qui expliquent les variations d'expression du gène et les variations de coloration sont soulignés et en gras (SNP1 : CTG/ACC ; SNP2 : GTG/AGG)

Ainsi, chez le poulet domestique une ou plusieurs mutations au sein du gène BCDO2 ont été identifiées au niveau du chromosome 24 comme étant responsables de la variation de la couleur jaune de la peau. Ces mutations sont liées à des variations des teneurs en caroténoïdes en particulier celles en xanthophylles (Ericksson et al., 2008). De même, chez les ovins, une mutation « non-sens » au niveau du gène BCDO2 est étroitement associée à une accumulation des caroténoïdes dans le tissu adipeux et l'augmentation de sa couleur jaune (Våge et Boman, 2010). Chez les bovins, des variations d'expression du BCDO2 sont accompagnées par des variations des teneurs en β -carotène dans le plasma et le lait et par conséquent de leur couleur jaune (Berry et al., 2009). Plus récemment, une double mutation a été identifiée dans le promoteur du gène BCMO1 comme étant responsable des variations de la coloration jaune (b*) du filet (muscle P. major) chez le poulet (Le Bihan-Duval et al., 2010 ; Le Bihan-Duval et al., 2011). Cette double mutation a été caractérisée suite à une identification en premier lieu d'un QTL (Quantitative Trait Loci) sur le chromosome 11 contrôlant la couleur jaune et rouge de la viande du filet (Nadaf et al., 2007). Il a par la suite été démontré que l'effet de ce QTL sur la couleur passait par une variation d'expression du gène BCMO1 (Figure 21). Le séquençage du gène BCMO1 a permis d'identifier une double-mutation fonctionnelle au niveau du promoteur du gène (Figure 22) qui explique en grande partie les variations d'expression observées entre individus (Le Bihan-Duval et al., 2011).

En biologie humaine, le développement des études d'association au niveau du génome entier ou études pangénomiques (Genome-Wide Association Study) constitue aujourd'hui l'une des approches les plus utilisées pour identifier les variants génétiques et leurs associations présumées avec les phénotypes (Borel, 2011). Une étude récente a ainsi montré qu'un SNP (Single Nucleotide Polymorphism) proche du gène BCMO1 (rs6564851) est significativement associé avec des variations des teneurs circulantes en caroténoïdes (Ferrucci et al., 2009). Plus précisément, l'allèle G de ce SNP est associé à de fortes concentrations en α -carotène et β -carotène mais aussi à de faibles concentrations en lycopène ainsi qu'en lutéine et zéaxanthine. Ces données confirment le rôle important joué par le gène BCMO1 non seulement dans le métabolisme des caroténoïdes provitamines A, mais aussi dans celui des caroténoïdes non provitamines A comme la lutéine et la zéaxanthine avec un mécanisme encore inconnu jusqu'à présent. Il existe aussi d'autres variants génétiques (SNP) au sein de plusieurs enzymes qui ont pu être associés à des variations de teneurs en caroténoïdes, au niveau plasmatique mais aussi tissulaire (Borel, 2011). Parmi les protéines

Tableau 13 : Substrats dont les concentrations sont affectés par des variants (SNPs) génétiques de différentes protéines¹ impliquées dans le métabolisme des caroténoïdes (d'après Borel et al., 2011).

	Lutéine	Zéaxanthine	β -cryptoxanthine	α -carotène	β -carotène	Lycopène	Référence ²
ABCG5	x						1
Apo-B					x	x	2
Apo-A-IV						x	2
ApoE				x		x	3
SCARB1			x	x	x		2
CD36	x						5
FABP2						x	8
LPL			x	x	x		4
HL				x	x		8
BCMO1	x	x			x	x	5, 6, 7, 11
BCDO2					x		9, 10

¹ABCG5 : ATP-binding cassette sub-family G member 5 ; Apo-B : Apolipoprotein B; Apo-A-IV : Apolipoprotein A-IV; ApoE : Apolipoprotein E; SCARB1 : Scavenger receptor class B member 1 (SRB1) ; CD36 : Cluster determinant 36 ; FABP2 : Fatty acid-binding protein 2 ; LPL : Lipoprotein lipase ; HL : Hepatic lipase ; BCMO1 : β , β -carotene 15,15'-monooxygenase 1 ; BCDO2 : β , β -carotene 9',10'-dioxygenase 2.

²1 : Herron et al. (2006) ; 2 : Borel et al. (2007) ; 3 : Ortega et al. (2005) ; 4 : Herbeth et al. (2007) ; Borel et al. (2010) ; 6 : Ferrucci et al. (2009) ; 7 : Leung et al. (2009) ; 8 : Borel et al. (2009) ; 9 : Tian et al. (2009) ; 10 : Väge et al. (2010) ; 11 : Le Bihan-Duval et al. (2011). Données obtenues chez l'humain (1-8), le bovin (9), l'ovin (10) et le poulet (11).

concernées, plusieurs impliquées dans le métabolisme des lipides pourraient être des acteurs clés du métabolisme des caroténoïdes. Cependant, les rôles et les effets de ces gènes ou/et de ces protéines dans le métabolisme des caroténoïdes nécessitent d'être confirmés par des études plus spécifiques à la fois fonctionnelles et moléculaires. Le tableau 13 résume l'état des connaissances en 2011 sur les variants génétiques identifiés comme étant impliqués dans le contrôle des concentrations plasmatiques ou tissulaires des caroténoïdes.

Des études cellulaires ont également permis d'identifier d'autres variants génétiques aux niveaux des protéines impliquées dans le métabolisme des caroténoïdes. En effet, il a été décrit que CD36 et SR-BI affectent le statut cellulaire en caroténoïdes chez les mammifères (van Bennekum et al., 2005 ; Moussa et al., 2008, 2011).

V.7. Impact des apports en caroténoïdes et en vitamine A sur la coloration des tissus

Les facteurs régulant le métabolisme des caroténoïdes décrits ci-dessus peuvent avoir des interactions entre eux, essentiellement au niveau de leur absorption intestinale, leur transport par les lipoprotéines, leur conversion par les enzymes, et leur accumulation ou leur stockage dans les différents tissus, affectant ainsi la coloration de ceux-ci.

Sachant que les animaux sont incapables de synthétiser les caroténoïdes, ils doivent se les procurer à travers les aliments (Bernstein et al., 2010). Chez les volailles en particulier les caroténoïdes apportés par l'alimentation sont en partie responsables des variations de couleur de la viande et de la peau, notamment des teintes rouge et jaune (Toyomizu et al., 2001 ; Na et al., 2004).

En Europe, les principales sources des caroténoïdes dans les aliments destinés aux volailles sont le maïs, les sous-produits de maïs (gluten de maïs), la farine de luzerne, les fleurs de souci et le paprika (Nys, 2000). De ce fait, les aliments contiennent principalement de la lutéine, de la zéaxanthine, de la cryptoxanthine et parfois du β -carotène (dans le cas de farine de luzerne). Toutefois, il existe des différences importantes de teneurs en caroténoïdes entre les différents types de ration. Ainsi, les teneurs en caroténoïdes, particulièrement en xanthophylles (lutéine et zéaxanthine), d'un régime à base de maïs sont deux fois supérieures

à celles d'un régime à base de blé et/ou d'orge (Surai et Sparks, 2001). Ces aliments déterminent donc les concentrations tissulaires en caroténoïdes et par conséquent la couleur de la viande (Surai et al., 2001 ; Na et al., 2004). Les volailles accumulent ainsi plus de deux fois plus de caroténoïdes (lutéine et zéaxanthine principalement) quand ils reçoivent un régime à base de maïs plutôt qu'un régime à base de blé et/ou d'orge (Surai et Sparks, 2001, Surai, 2002). Donc les profils des caroténoïdes dans les tissus sont fortement liés aux profils de ces micronutriments dans les aliments et il est possible de moduler les concentrations plasmatique et tissulaire en caroténoïdes en modifiant les ingrédients des rations de base ou en supplémentant les aliments destinés aux animaux avec des caroténoïdes (Surai et al., 1998). A titre d'exemple, supplémenter des poulets avec des levures contenant des teneurs allant de 15 à 30 ppm d'astaxanthine induit une augmentation de l'indice de rouge (a^*) du tissu adipeux, de la peau et du filet sans affecter leur luminosité (L^*) ou leur indice de jaune (b^*) (Akiba et al., 2001).

Les teneurs alimentaires en vitamine A jouent aussi un rôle crucial dans la détermination de la pigmentation chez les espèces aviaires. Li et al. (2008) ont ainsi constaté que des apports variables en vitamine A induisent des variations des paramètres de couleur au niveau de la peau qui couvre le muscle pectoral et la cuisse. Ces auteurs rapportent qu'une augmentation des apports alimentaires en vitamine A sous forme d'acide rétinoïque (la forme active de la vitamine A), induit une augmentation de la coloration jaune (b^*) de la peau au niveau de la cuisse et du filet chez le poulet de chair. Comme mentionné précédemment, l'acide rétinoïque réprime l'expression de gènes impliqués dans le clivage (BCMO1) et l'absorption cellulaire des caroténoïdes (SCARB1) (Bachmann et al., 2002 ; Lietz et al., 2010 ; Lobo et al., 2010), ce qui pourrait expliquer les variations de couleur observées en lien avec l'apport en acide rétinoïque de la ration.

Résultats

Un certain nombre de gènes ou de protéines impliqués dans les variations de qualité de la viande chez le poulet ont été récemment mis en évidence (Sibut et al., 2008, 2011). Le travail expérimental de ma thèse avait pour objectif d'approfondir l'étude des mécanismes moléculaires identifiés. Ma thèse s'articule autour de deux thématiques qui impliquent des acteurs moléculaires et des critères de qualité de viandes indépendants. Toutefois, dans les deux cas, nous avons développé une stratégie d'étude commune qui consistait à étudier l'impact de facteurs alimentaires en interaction avec l'origine génétique des animaux, l'objectif étant de mieux définir les lois de réponse en fonction des caractéristiques des animaux.

Le premier volet de ma thèse s'est intéressé à la régulation par l'alimentation, notamment l'apport en protéines, de voies métaboliques qui contrôlent le turnover du glycogène dans le muscle. Nous avons considéré dans notre étude deux lignées expérimentales de poulet, sélectionnées de façon divergente sur l'adiposité abdominale, afin de mieux comprendre les liens éventuels entre l'équilibre des dépôts corporels (muscle/gras) et la mise en réserve du glycogène au niveau musculaire. Nous avons en particulier exploré la régulation des voies de signalisation impliquant l'AMPK et plusieurs de ses cibles moléculaires qui contrôlent le turnover du glycogène musculaire mais aussi la synthèse protéique. Nos résultats mécanistiques ont été mis en relation avec les principaux caractères de qualité qui sont influencés par le pH ultime de la viande, à savoir sa couleur et son pouvoir de rétention d'eau. Les résultats de ce volet ont fait l'objet d'un premier article :

Jlali M, Gigaud V, Métayer-Coustard S, Sellier N, Tesseraud S, Le Bihan-Duval E, Berri C. 2012. Modulation of glycogen and breast meat processing ability by nutrition in chickens: impact of crude protein level in two chicken genotypes. J. Anim. Sci., 90(2):447-455.

Le deuxième volet de ma thèse a été consacré à l'exploration des mécanismes qui contrôlent les teneurs en caroténoïdes du muscle en lien avec la coloration de la viande. En effet, notre laboratoire a récemment découvert un polymorphisme fonctionnel dans le promoteur du gène BCMO1 qui est associé à des variations de coloration jaune de la viande (filet) et de leurs teneurs en pigments xanthophylles (Le Bihan-Duval et al., 2010, 2011). Ceci nous a conduits à explorer le mode d'action de cette mutation en interaction ou non avec l'apport en caroténoïdes dans la ration et d'en évaluer les conséquences sur le métabolisme, la coloration

des tissus et plus généralement les performances zootechniques. Grâce au développement d'un test génétique, nous avons pu sélectionner très tôt après l'éclosion des individus différant par leur génotype au locus BCMO1 mais présentant un fond génétique homogène. Ceci constitue un modèle unique pour mieux comprendre le rôle du gène BCMO1 dans le contrôle du métabolisme des caroténoïdes et de la vitamine A chez le poulet et son mode de régulation par l'alimentation, notamment l'apport en β -carotène. Au-delà des effets au niveau du muscle et de la viande, nous avons plus largement exploré les effets du polymorphisme sur l'activité du gène au niveau des sites d'absorption (duodénum), de transport (plasma) et d'accumulation (foie) des caroténoïdes et évalué l'incidence sur l'activité d'autres gènes impliqués dans le transport et le métabolisme des caroténoïdes (SCARB1, CD36, BCDO2). Les résultats de ce deuxième volet expérimental font l'objet de deux articles, le premier soumis à Journal of Animal Science et le second à soumettre à Journal of Nutrition

M. Jlali, B. Graulet, B. Chauveau-Duriot, M. Chabault, E. Godet, S. Leroux, C. Praud, E. Le Bihan-Duval, M. J. Duclos, C. Berri. 2012. A mutation in the promoter of the chicken β,β -carotene 15,15'-monooxygenase 1 (BCMO1) gene alters xanthophyll metabolism through a selective effect on BCMO1 mRNA levels in the breast muscle. Soumis à J. Anim. Sci.

M. Jlali, B. Graulet, B. Chauveau-Duriot, E. Godet, C. Praud, C. Simões Nunes, E. Le Bihan-Duval, M.J. Duclos, C. Berri. 2012. Nutrigenetics of carotenoid metabolism in the chicken: a polymorphism at the BCMO1 locus alters the response to dietary β -carotene. Pour soumission à J. Nut.

VOLET 1 : Régulation du métabolisme du glycogène musculaire et conséquence pour la qualité technologique

I.1. Introduction

Contrôler la chute du pH dans le muscle *post-mortem* constitue un élément clef pour améliorer la qualité des viandes chez les volailles. Ainsi, à l'instar du porc, le pH ultime de la viande représente un facteur clé de variation de plusieurs critères de qualité dont le pouvoir de rétention en eau (PRE) qui va influencer la couleur, la texture, les rendements technologiques et éventuellement la capacité de conservation de la viande fraîche. Ces critères vont aussi être influencés par la cinétique initiale de chute de pH (souvent évaluée au travers de la mesure du pH à 15 minutes) qui est principalement liée à l'activité physique des animaux avant sa mort : plus un animal se débat sur la chaîne d'abattage, plus la chute du pH se fera rapidement entraînant des défauts de type PSE (pale, soft, exudative) (Debut et al., 2003 ; Berri et al., 2005). Les études menées à l'Unité de Recherches Avicoles (URA, INRA, Nouzilly) ont montré qu'il existe un lien fort entre la teneur en glycogène du muscle au moment de la mort des animaux (encore appelée potentiel glycolytique ou PG) et le pH ultime de la viande : plus le glycogène présent dans le muscle est élevé, plus le pH final de la viande sera acide (Berri et al., 2001, 2005, 2007). Par ailleurs, les travaux de l'URA ont permis de démontrer le fort déterminisme génétique des caractères de qualité des viandes, en particulier de ceux liés aux variations de chute de pH *post-mortem* (Le Bihan-Duval et al., 2001, 2008 ; Chabault et al., 2010). Au-delà des caractéristiques génétiques de l'animal, de nombreux autres facteurs peuvent affecter la chute de pH. Parmi eux, les conditions de pré-abattage évoquées précédemment mais aussi les modes de production. Ainsi, il a récemment été démontré que l'allongement de la durée d'élevage augmente le pH ultime de la viande (Baéza et al., 2012) *via* une diminution des réserves en glycogène du muscle (Gigaud et al., 2007). De même, la composition de la ration (apport en acides aminés ou teneurs en protéines) peut affecter le pH ultime de la viande induisant des modifications de qualité notamment au niveau technologique (Berri et al., 2008 ; Mercier et al., 2009 ; Yalçın et al., 2010).

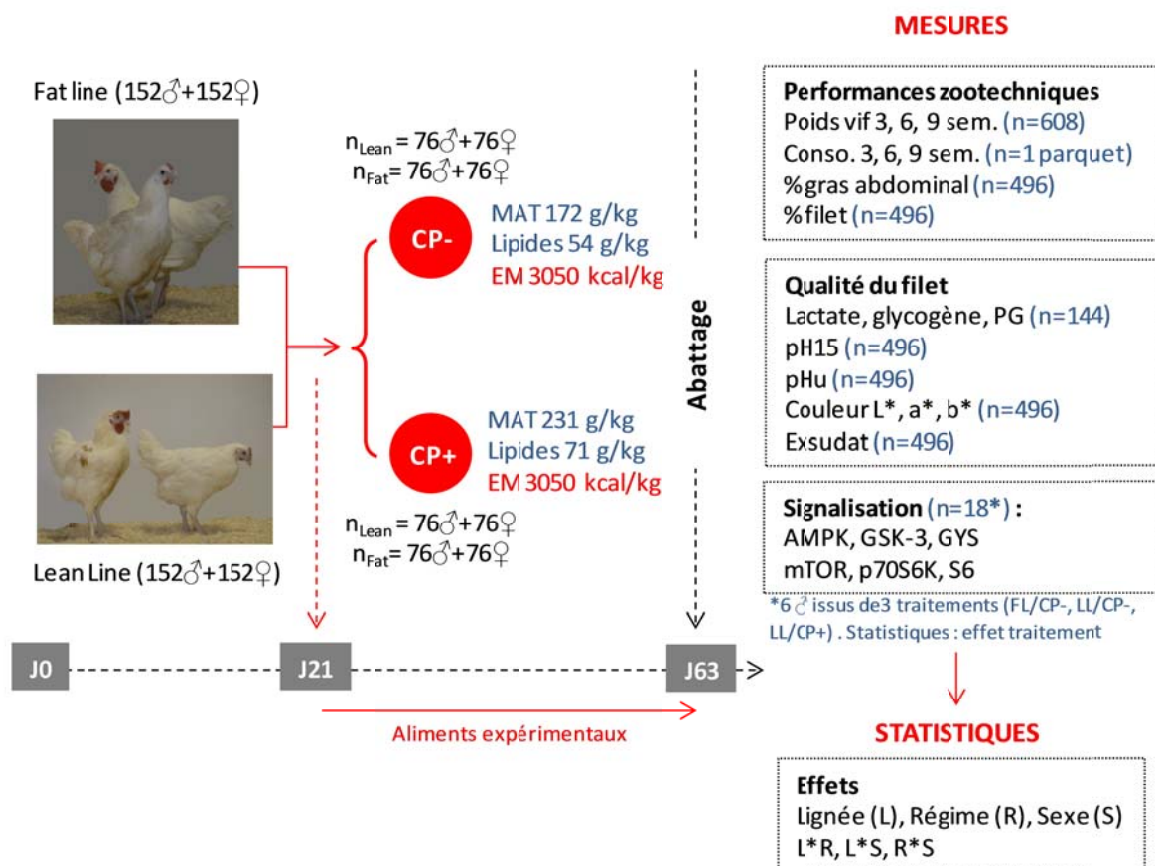


Figure 23. Dispositif expérimental. Les animaux des lignées maigre (Lean line, LL) et grasse (Fat line, FL) ont été répartis équitablement à 21 jours dans deux groupes de régime (crude protein 17% ou CP-, crude protein 23% ou CP+).

PG : potential glycolytique, pH15 et pHu : pH mesurés 15 min. et 24 h post-mortem, respectivement ; L* : Luminance, a* et b* : indice de rouge et de jaune, respectivement. AMPK : adenosine monophosphate activated protein kinase ; GSK-3 : glycogen synthase kinase 3 ; GYS : glycogen synthase ; mTOR : mammalian target of rapamycin ; p70S6K : p70 ribosomal S6 kinase ; S6 : protein S6 ribosomal.

Plus généralement, il semble y avoir un lien entre la croissance et la composition corporelle des animaux (ratio muscularité/adiposité) et le métabolisme *post-mortem* de leurs muscles. Ainsi, chez le poulet, l'augmentation des rendements en muscles pectoraux (filet) et la diminution de l'adiposité abdominale obtenues par sélection correspondent à un ralentissement de la chute initiale de pH et une élévation de sa valeur finale (pH ultime) via une diminution des réserves en glycogène du muscle (Berri et al., 2001, 2007 ; Sibut et al., 2008). La comparaison de lignées extrêmes en terme de croissance (issues d'une sélection divergente sur le poids vif à 9 semaines) indique par ailleurs que les animaux les plus lourds sont à la fois plus gras et présentent les teneurs en glycogène les plus fortes au moment de l'abattage et une viande nettement plus acide que celle des animaux légers (Nadaf et al., 2007). Le lien entre qualité des viandes et composition corporelle peut aussi être observé lorsque cette dernière est modulée par voie nutritionnelle. Ainsi, la lysine, apportée dans le régime pour améliorer la composition corporelle (augmentation des rendements en muscle et diminution de l'engraissement), augmente le pH ultime et le pouvoir de rétention d'eau de la viande fraîche (Berri et al., 2008).

Notre étude avait pour objectif de mieux comprendre les liens qui existent entre les caractéristiques de croissance des animaux, en particulier leur capacité à déposer des protéines ou des lipides, et leur capacité à mettre en réserve le glycogène au niveau du muscle pectoral. Afin de générer une gamme de variation en termes de développement musculaire et d'adiposité, nous avons comparé des poulets issus des lignées expérimentales maigre et grasse (issues d'une sélection divergente sur l'engraissement abdominal, Leclercq et al., 1980) nourris avec un aliment croissance appauvri ou supplémenté en protéines par rapport à une ration de base classique contenant environ 20 % de protéines. L'intérêt d'étudier les lignées maigre et grasse venait aussi du fait des différences qu'elles présentent en termes de potentiel glycolytique (PG) et de qualité de viande (Sibut et al., 2008).

I.2. Dispositif expérimental et mesures

Le dispositif expérimental et les mesures réalisées sont décrits dans le schéma ci-contre (Figure 23). Ce schéma expérimental permet d'évaluer les effets respectifs du génotype, de l'alimentation et du sexe des poulets, mais aussi les interactions qui existent entre ces différents facteurs de variation. Les analyses effectuées ont permis de caractériser les

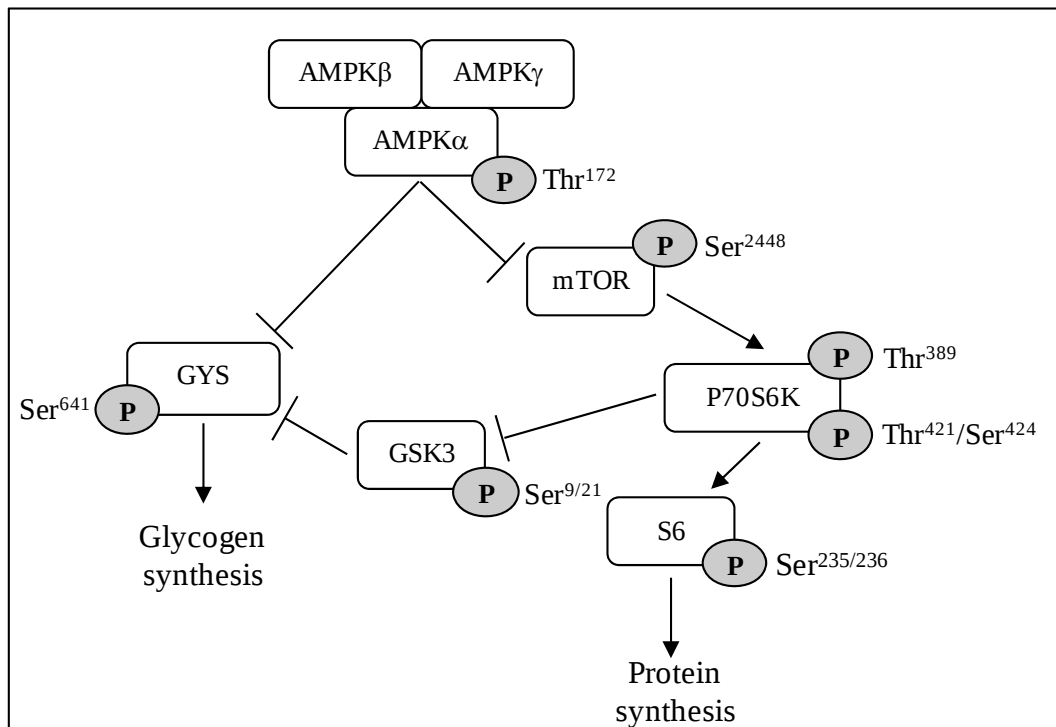


Figure 24. Voies de signalisation étudiées qui sont impliquées dans la régulation du turn-over du glycogène et de la synthèse protéique dans le muscle squelettique.

AMPK : adenosine monophosphate activated protein kinase ; GSK-3 : glycogen synthase kinase 3 ; GYS: glycogen synthase; mTOR: mammalian target of rapamycin; p70S6K: p70 ribosomal S6 kinase; S6: protein S6 ribosomal ;  site de phosphorylation ; Thr : thréonine ; Ser : sérine.

performances de croissance et de composition corporelle des animaux et certaines propriétés de leur muscle pectoral, incluant des données biochimiques et des indicateurs de la qualité technologique des viandes.

Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires régulant les variations de teneurs en glycogène observées au niveau musculaire, nous avons étudié la régulation de plusieurs voies de signalisation impliquées dans le contrôle du turnover du glycogène mais aussi de la synthèse protéique au niveau musculaire (Figure 24). Pour ce faire nous avons analysé par western blot les niveaux d'activation par phosphorylation d'un certain nombre d'enzymes intervenant dans ces voies de signalisation. Parmi elles, le complexe AMPK, senseur énergétique majeur au niveau de la cellule, est à la fois impliqué dans le contrôle de la synthèse protéique et dans celui du turnover du glycogène musculaire. Pour évaluer l'impact de nos traitements (génétique x alimentation) sur la mise en réserve du glycogène dans le muscle nous avons étudié la régulation de la glycogène synthase (GYS) *via* l'AMPK et la GSK-3. Pour déterminer les conséquences éventuelles en terme de synthèse protéique, nous avons étudié la voie de signalisation AMPK-mTOR-P70S6K-S6 impliquée dans le processus de traduction des ARN messagers en protéines.

I. 3. Résultats de l'étude (article 1)

Les principaux résultats de cette étude ont été publiés en février 2012 dans la revue '*Journal of Animal Science*'. Certains éléments complémentaires ainsi que les perspectives à ce travail seront discutés dans le paragraphe suivant la présentation du manuscrit.

**Modulation of glycogen and breast meat processing ability by nutrition in chickens:
Effect of crude protein level in 2 chicken genotypes**

M. Jlali, V. Gigaud, S. Métayer-Coustard, N. Sellier, S. Tesseraud, E. Le Bihan-Duval and
C. Berri

J ANIM SCI 2012, 90:447-455.

doi: 10.2527/jas.2011-4405 originally published online October 7, 2011

The online version of this article, along with updated information and services, is located on
the World Wide Web at:

<http://jas.fass.org/content/90/2/447>



American Society of Animal Science

www.asas.org

Modulation of glycogen and breast meat processing ability by nutrition in chickens: Effect of crude protein level in 2 chicken genotypes¹

M. Jlali,* V. Gigaud,† S. Métayer-Coustard,* N. Sellier,‡ S. Tesseraud,*
E. Le Bihan-Duval,* and C. Berri*²

*INRA, UR83, Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France; †ITAVI, Unité de Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France; and ‡INRA, UE1295, Pôle Expérimental Avicole de Tours, F-37380 Nouzilly, France

ABSTRACT: The aim of the study was to evaluate the impact of 2 isoennergetic growing diets with different CP (17 vs. 23%) on the performance and breast meat quality of 2 lines of chicken divergently selected for abdominal fatness [i.e., fat and lean (LL) lines]. Growth performance, breast and abdominal fat yields, breast meat quality parameters (pH, color, drip loss), and muscle glycogen storage at death were measured. Increased dietary CP resulted in increased BW, increased breast meat yield, and reduced abdominal fatness at slaughter regardless of genotype ($P < 0.001$). By contrast, dietary CP affected glycogen storage and the related meat quality parameters only in the LL chickens. Giving LL chickens the low-CP diet led to reduced concentration of muscle glycogen ($P < 0.01$), and as a result, breast meat with a higher ($P < 0.001$) ultimate pH, decreased ($P < 0.001$) lightness, and reduced ($P <$

0.001) drip loss during storage. The decreased muscle glycogen content observed in LL receiving the low-CP diet compared with the high-CP diet occurred concomitantly with greater phosphorylation amount for the α -catalytic subunit of adenosine monophosphate-activated protein kinase and glycogen synthase. This was consistent with the reduced muscle glycogen content observed in LL fed the low-CP diet because adenosine monophosphate-activated protein kinase inhibits glycogen synthesis through its action on glycogen synthase. Our results demonstrated that nutrition is an effective means of modulating breast meat properties in the chicken. The results also highlighted the need to take into account interaction with the genetic background of the animal to select nutritional strategies to improve meat quality traits in poultry.

Key words: adenosine monophosphate-activated protein kinase, chicken, crude protein, genotype, meat quality, muscle glycogen

©2012 American Society of Animal Science. All rights reserved.

J. Anim. Sci. 2012. 90:447–455
doi:10.2527/jas.2011-4405

INTRODUCTION

Controlling the postmortem decrease in pH in the muscle is crucial to improving the functional properties of poultry meat. Glycogen content in chicken breast muscle at death constitutes one of the main factors of variation in the ultimate pH of meat (pHu), which

in turn affects several breast meat properties including water-holding capacity, color, and firmness (Berri et al., 2005, 2007; Ylä-Ajos et al., 2007). There is considerable evidence that muscle glycogen, pH, and related meat quality traits are under both genetic (Le Bihan-Duval et al., 2001, 2008) and nutritional (Berri et al., 2008; Yalçın et al., 2010) controls. These traits may be related to body composition because chickens selected for breast development and leanness are characterized by higher pHu in breast meat (Berri et al., 2001; Sibut et al., 2008). The aim of the study presented here was to evaluate the impact of dietary CP on growth, body composition, and breast meat quality in 2 experimental lines of chickens divergently selected for abdominal fatness [i.e., fat (FL) and lean (LL) lines]. Compared with LL, FL chickens exhibit 2 to 3 times more abdominal fat and a greater amount of muscle glycogen, resulting in breast meat with low pHu, as well as increased

¹This study was supported by a grant from FranceAgriMer. Maamer Jlali is a PhD student supported by grants from INRA and the government of Tunisia. The authors thank the staff of the breeding facilities (INRA, Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours, Nouzilly, France) and the research unit (INRA, Nouzilly, France) for technical assistance. We are particularly grateful to Thierry Bordeau (INRA, Nouzilly, France) for managing bird slaughter, tissue sampling, and meat quality measurements.

²Corresponding author: Cecile.Berri@tours.inra.fr

Received June 24, 2011.

Accepted September 27, 2011.

drip loss and pale color (Sibut et al., 2008, 2011). To investigate the molecular mechanisms controlling variations in muscle glycogen, the phosphorylation levels of adenosine monophosphate (**AMP**)-activated protein kinase (**AMPK**), glycogen synthase kinase 3 (**GSK3**), and their downstream metabolic target, glycogen synthase (**GYS**), were explored. The effects of genotype and dietary CP were also evaluated on the mammalian target of rapamycin (**mTOR**), p70 ribosomal S6 kinase (**p70S6K**), and its target ribosomal protein S6 (**S6**), whose activation by insulin or AA promotes protein synthesis in chicken muscle (Tesseraud et al., 2007, 2009).

MATERIALS AND METHODS

All experiments were carried out with due regard to legislation governing the ethical treatment of animals, and investigators were certified by the French government to conduct animal experiments.

Chemicals and Antibodies

Nitrocellulose membrane, pre-made polyacrylamide solution, SDS, and protein standards were purchased from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). The BSA (fraction V, RIA grade) was obtained from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). Anti-phospho-Thr172-AMPK α , anti-phospho-Ser641-GYS, anti-phospho-Ser21/9-GSK3 α/β , anti-phospho-Ser2448-mTOR, anti-mTOR, anti-phospho-Thr389-p70S6K, anti-phospho-Thr421-Ser424-p70S6K, anti-phospho-Ser235/236-S6, and anti-S6 antibodies were obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, MA), and anti-AMPK subunit α 1 antibody was purchased from Upstate Biotechnology Inc. (Lake Placid, NY). Anti-vinculin used as loading control for all Western blots was obtained from Sigma Chemical Company. Alexa Fluor secondary antibodies were obtained from Molecular Probes (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Birds and Experimental Design

The chickens originated from the FL and LL lines that were divergently selected for high and low abdominal fatness at 9 wk of age (Leclercq et al., 1980). A total of 608 male and female chickens (304 from each line) were reared in a conventional poultry house at the INRA experimental poultry unit (UE1295 PEAT, Nouzilly, France). At hatching, chicks were allocated into 4 groups (2 by diet), each containing 152 individuals (76 by line and by sex). All birds were given ad libitum access to water and diet and received the same starter feed until 3 wk of age (Table 1). Each group then received experimental isoenergetic diets from 3 to 9 wk varying in CP level: the **CP**– diet containing 17% and the **CP**+ diet containing 23% (Table 1). Chickens were individually weighed at 3, 6, and 9 wk of

age. Feed intake was monitored by diet after 3, 6, and 9 wk. At 9 wk, after 7 h of feed withdrawal, 496 birds (chosen at random) were weighed, slaughtered, and the carcass processed as described in Berri et al. (2007). Muscle tissues were collected 15 min postmortem from 36 birds by treatment (chosen at random) for glycolytic potential (**GP**) measurement and protein solubilization, then immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

Carcass, Muscle, and Meat Characteristics

All carcasses were processed 1 d after slaughter. Abdominal fat and breast muscles [pectoralis minor and pectoralis major (**P. major**)] were removed and weighed, and their respective yields were calculated and expressed as a percentage of BW at slaughter. The

Table 1. Ingredients and characteristics of starter and experimental diets fed to chickens¹

Item	Diet		
	Starter	CP–	CP+
Ingredient, g/kg			
Soybean meal	312.2	146.3	325.0
Corn	275.5	444.0	264.6
Wheat	204.1	300.0	276.9
Rapeseed oil	50	23.9	50.0
Corn gluten	17.9	50.0	50.0
Peas	100	—	—
Dicalcium phosphate	18.5	15.5	15.0
Calcium carbonate	11.9	10.0	9.0
Salt (NaCl)	4	3.0	3.0
Lysine HCl	0.08	1.7	1.2
DL-Methionine	1.32	1.1	1.2
Threonine	—	0.4	0.1
Tryptophan	—	0.1	—
Premix ²	4.0	4.0	4.0
Calculated content			
ME, MJ/kg	12.96	12.75	12.75
CP, g/kg	217	170	229
Starch + total sugar, g/kg	387	501	384
Lysine, g/kg	11.63	7.97	11.80
Methionine, g/kg	4.57	4.09	4.91
TSAA, ³ g/kg	8.22	7.38	8.90
Threonine, g/kg	8.13	6.43	8.51
Tryptophan, g/kg	2.47	1.70	2.49
Calcium, g/kg	12.26	9.01	9.01
Available P, g/kg	4.35	3.80	3.81
Measured characteristics			
CP, g/kg	222	172	231
Crude fat, g/kg	71.0	53.8	73.1

¹Experimental diets were isoenergetic but had different CP levels: CP– = 17% of CP; CP+ = 23% of CP.

²Supplied per kilogram of diet: retinyl acetate, 15,000 IU; cholecalciferol, 5,000 IU; DL- α tocopherol acetate, 100 mg; menadione, 5 mg; thiamine, 5 mg; riboflavin, 8 mg; pyridoxine, 7 mg; cyanocobalamin, 0.02 mg; niacin, 100 mg; folic acid, 3 mg; biotin, 0.3 mg; calcium pantothenate, 25 mg; choline, 550 mg; manganese oxide, 80 mg; zinc sulfate, 90 mg; iron sulfate, 50 mg; copper sulfate, 20 mg; calcium iodine, 2 mg; sodium selenium, 0.2 mg; cobalt carbonate, 0.6 mg; butylated hydroxytoluene, 125 mg.

³Total sulfur AA.

GP of P. major muscle was measured according to Dalrymple and Hamm (1973) and calculated according to Monin and Sellier (1985). All muscle and meat quality parameters were measured as described in Berri et al. (2007). The pH of P. major muscle was recorded 15 min (pH15) and 24 h postmortem (pHu), and meat quality evaluation was performed by measuring the color parameters for lightness (L^*), redness (a^*), and yellowness (b^*) 24 h postmortem and by evaluating drip loss after a 4-d storage at 2°C.

Western Blotting Analysis

Western blot analyses were performed on a subset of P. major samples from 18 male birds chosen at random from 3 of the 4 treatments [FL fed the low CP diet (FL/CP−) and LL fed either the low- (LL/CP−) or the high-CP (LL/CP+) diet, $n = 6$ per treatment]. The FL chickens fed the FL/CP+ diet were not included in the comparison because of the lack of effect of the CP on GP and related meat quality traits (pHu, L^* , drip loss) in this line. The FL/CP− was selected instead of the FL/CP+ to assess the line effect observed for GP and related traits when birds were fed the CP− diet. Muscle lysates were prepared as described previously (Duchêne et al., 2008a,b). Protein concentrations were determined using the Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad). Muscle lysates (90 µg of protein) were subjected to SDS-PAGE under reducing conditions on 10 or 7.5% (only for mTOR) gels. Separated proteins were transferred to nitrocellulose membranes then were blocked for 1 h in 5% nonfat dry milk or 5% BSA (only for mTOR) diluted in Tris-buffer saline with 0.1% Tween-20 (TBS/T; Sigma). After three 5-min washes by TBS/T, membranes were incubated overnight with primary antibodies diluted at 1:1,000 in TBS/T with 5% nonfat dry milk or 5% BSA (only for mTOR). On completion of incubation of the primary antibody, each membrane was washed 3 times for 5 min with TBS/T. Membranes were then incubated with an Alexa Fluor secondary antibody (Molecular Probes, Interchim, Montluçon, France) diluted at 1:2,000 in Odyssey Blocking Buffer (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) for 1 h with gentle agitation. After three 5-min washes, bands were visualized by infrared fluorescence by the Odyssey Imaging System (LI-COR) and quantified by Odyssey infrared imaging system software (Application software, version 1.2). For each antibody, 6 samples by treatment ($n = 18$) were run on 2 separate gels, 3 samples of each treatment being present on each blot to avoid a technical bias effect.

Statistical Analysis

All data were analyzed using SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). The accepted type I error was 5%. The effects of line, diet, sex, and their possible interactions were analyzed in relation to BW, carcass yield, mus-

cle, and meat characteristics by 3-way ANOVA (GLM procedure), and the effects of treatment (line $\times$ diet) in relation to protein assays were analyzed by 1-way ANOVA (GLM procedure). Comparisons of means for each significant effect were performed by Student-Newmann-Keuls's test using the SNK statement of the GLM procedure. Pearson correlation coefficients were analyzed with the CORR procedure to assess the relationship between muscle and meat traits. Values are expressed as means.

RESULTS

Growth Performance, Carcass, and P. Major Muscle Characteristics

The main effects of and interactions between line, diet, and sex on carcass and P. major muscle traits are presented in Table 2. Body weight and yields were affected by line ($P < 0.001$), diet ($P < 0.001$), and sex ($P < 0.001$). There was an interaction between diet and sex ($P < 0.05$) for BW, the effect of the diet ($P < 0.001$) being slightly more pronounced in males. At slaughter, FL chickens were heavier ($P < 0.001$) and exhibited reduced ($P < 0.001$) breast meat yield and greater ($P < 0.001$) abdominal fat yield compared with LL chickens. Males were heavier ($P < 0.001$) and exhibited less ($P < 0.001$) abdominal fatness but similar breast meat yield compared with females. Chickens fed the CP+ diet exhibited heavier ($P < 0.001$) BW at slaughter, with slightly greater ($P < 0.001$) breast meat yield and decreased ($P < 0.001$) abdominal fat yield compared with chickens fed the CP− diet (Table 2). The P. major pH15, an indicator of postmortem pH decline, was not affected by any of the effects (genotype, diet, sex). Significant interactions between line and diet ($P < 0.001$) were found for GP, which is affected by diet only in LL (Table 3). In this genotype, greater ($P < 0.01$) GP was found in P. major muscle in chickens fed the CP+ diet than in chickens fed the CP− diet. The GP of the P. major muscle was negatively correlated with meat pHu, which in turn was negatively correlated with meat lightness (L^*) and drip loss in both chicken lines (Table 4). As a consequence, lower pHu, lighter (increased L^*) and less red (decreased a^*) color, as well as greater drip loss were found ($P < 0.001$) in P. major muscle in LL fed the CP+ diet than those fed the CP− diet. In the F line, redness was also reduced ($P < 0.001$) in chickens fed the CP+ diet compared with those fed the CP− diet. Meat yellowness was affected by the sex, genotype, and diet ($P < 0.001$). Breast meat was more yellow in females than in males, in LL than in FL, and with the CP− than with the CP+ diet. Sex also significantly affected ($P < 0.01$) muscle GP, as well as all related meat traits. Females that exhibited greater ($P < 0.01$) muscle GP were also characterized by breast meat with lower ($P < 0.001$) pHu, lighter ($P < 0.001$) color, and greater ($P < 0.001$) drip loss than males.

Molecular Mechanisms Involved in P. Major Muscle Metabolism

The expression and phosphorylation level of proteins involved in glycogen and protein metabolism (Figure 1) were investigated by Western blot in the P. major muscle in 3 of the 4 treatments under study [i.e., LL fed the CP– diet (LL/CP–) and CP+ diet (LL/CP+) and FL fed the CP– diet (FL/CP–)]. The results were expressed as the amount relative to vinculin chosen as the reference protein. Quantitative analysis by Western blot revealed no significant difference in AMPK α 1 protein content between treatments (Figure 2A). Conversely, the phosphorylation level of the α -subunit of AMPK on the Thr¹⁷² residue was about 40% greater ($P < 0.01$) in the muscle of LL/CP– compared with that of FL/CP– and LL/CP+. Differences between treatments were not significant when expressed in relation to AMPK α 1 protein content despite the phosphorylation level of the α -subunit of AMPK on the Thr¹⁷² residue being about 30% greater in LL/CP– than in the other 2 groups (Figure 2A). A greater ($P < 0.01$) phosphorylation level on the Ser⁶⁴¹ residue of GYS was also observed in LL/CP– compared with LL/CP+ and FL/CP–, whereas the GSK3 phosphorylation level on Ser^{21/9} was not affected by any treatment (Figure 2B). The consequences of dietary protein and genotype on the mTOR/p70S6K/S6 signaling pathway were also evaluated by Western blot. Quantitative analysis revealed decreased ($P < 0.05$) mTOR protein content in FL/CP– compared with LL/CP+ and LL/CP– chickens (Figure 3A). However, the phosphorylation level of mTOR on the Ser²⁴⁴⁸ residue, whether related to mTOR protein content or not, was not affected by any treatment. There was no impact of treatment on p70S6K and ribosomal protein S6 content, or on the phosphorylation levels of p70S6K on the Thr³⁸⁹ or Thr⁴²¹/Ser⁴²⁴ residues, or of ribosomal protein S6 on the Ser^{235/236} residues (Figure 3B and C).

DISCUSSION

There is considerable evidence that breast meat quality is highly related to animal growth and body composition in the chicken. This has been demonstrated on genetic models, such as the lean and fat lines used in the present study. As in the present study, Sibut et al. (2008) found that chickens originating from LL exhibited breast meat with higher pHu, darker color, and decreased drip loss compared with FL chickens. The differences between FL and LL observed for meat quality were related to differences in muscle glycogen content at death, estimated through the measurement of muscle GP, which were greater in FL. These results were consistent with several studies that suggested that water-holding ability and color of breast meat in poultry improved as carcass leanness and breast meat yield increased (Berri et al., 2001, 2007; Le Bihan-Duval et al., 2001). The differences in muscle glycogen and re-

Table 2. Body weights, yields, and pectoralis major muscle traits in relation to line, dietary CP, and sex in 9-wk-old chickens¹

Item ²	No. of chickens	Line		Dietary protein, %				Sex			Interaction			
		Fat	Lean	P-value	17	23	P-value	Male	Female	P-value	Line $\times$ diet	Line $\times$ sex	Diet $\times$ sex	
BW, g	62	2,037	1,975	***	1,908	2,104	***	2,217	1,787	***	NS	NS	*	
Abdominal fat yield, % of BW	62	4.66	2.09	***	3.67	3.08	***	2.92	3.84	***	NS	NS	NS	
Breast yield, % of BW	62	12.08	13.32	***	12.53	12.87	***	12.63	12.77	NS	NS	NS	NS	
Pectoralis major trait														
GP, μ M/g	18	105.1	99.8	**	100.2	104.5	*	99.2	105.9	**	*	NS	NS	
pH15	62	6.51	6.55	NS	6.55	6.51	NS	6.51	6.55	NS	NS	NS	NS	
pHu	62	5.76	5.83	***	5.82	5.78	***	5.83	5.77	***	***	NS	NS	
L*	62	48.07	45.50	***	45.95	47.64	***	46.08	47.56	***	***	NS	NS	
a*	62	-0.40	1.17	***	0.86	-0.08	***	0.40	0.38	NS	***	NS	NS	
b*	62	9.05	12.44	***	11.58	9.91	***	10.42	11.07	***	***	NS	NS	
Drip loss, %	62	1.34	1.05	***	1.08	1.30	***	1.02	1.38	***	**	NS	NS	

¹Data expressed as means.

²GP = glycolytic potential; pH15 = pH measured 15 min postmortem; pHu = pH measured 24 h postmortem; L* = lightness; a* = redness; b* = yellowness.

NS = not significant; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Table 3. Effects of dietary CP level (17 vs. 23%) on pectoralis major muscle traits in fat and lean chicken lines¹

Item ²	No. of chickens	Line					
		Fat		<i>P</i> -value	Lean		<i>P</i> -value
		17%	23%		17%	23%	
GP, $\mu M/g$	36	104.8	105.4	NS	94.9	103.9	**
pHu	124	5.76	5.77	NS	5.88	5.79	***
L*	124	47.91	48.24	NS	43.95	47.04	***
a*	124	-0.17	-0.63	***	1.91	0.45	***
Drip loss, %	124	1.30	1.37	NS	0.87	1.23	***

¹Data expressed as means.²GP = glycolytic potential; pHu = pH measured 24 h postmortem; L* = lightness; a* = redness.NS = not significant; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001.

lated meat traits (pHu, L*, drip loss) observed between male and female chickens in the present study could be related to differences in carcass adiposity. The females exhibited both greater abdominal fat yield and greater glycogen content in P. major muscle at death than males, resulting in breast meat with lower pHu and greater lightness and drip loss. A possible link between carcass adiposity and breast meat quality is also supported by statistically significant correlation coefficients of -0.28 for male and of -0.24 for female between abdominal fatness and P. major pHu.

As already reported by Alleman et al. (2000), both FL and LL fed a high-protein diet were characterized by increased BW, decreased abdominal fatness, and increased breast meat yield compared with birds given a low-protein diet. Such effects on BW and yield were consistent with many studies carried out on commercial breeds showing that increasing dietary CP generally led to less fatty broilers with greater BW gain and breast meat yield (Fancher and Jensen, 1989a,b; Morris and Njuru, 1990; Deschepper and De Groote, 1995; Bartov and Plavnik, 1998; Temim et al., 2000; Widyaratne and

Drew, 2011). Unlike BW and yield, which were similarly affected by dietary CP content in both FL and LL lines, muscle glycogen and breast meat quality were only affected by dietary CP content in LL. In the latter line, reducing dietary CP from 23 to 17% resulted in breast meat with decreased glycogen content, higher pHu, darker color, and reduced drip loss. Similar effects of CP on meat pHu and lightness have recently been reported in 2 commercial broiler breeds (Yalçin et al., 2010). Except for this study and a former study that showed that increasing dietary lysine enhanced yield and pHu, and reduced drip loss of breast meat during storage (Berri et al., 2008), the impact of diet on chicken meat traits related to pHu and variations in muscle glycogen have received little attention. Several studies have attempted to modulate muscle glycogen storage and meat traits in pigs through finishing feeding programs. Indeed, it is possible to decrease muscle glycogen content in the pig at the time of slaughter by feeding diets low in available carbohydrates, resulting in positive effects on meat color and water-holding capacity (Rosenvold et al., 2001, 2002, 2003; Bee et al., 2006). Bee et al. (2006) reported that the effect of such diet to reduce glycogen depends on muscle type, the light part of semitendinosus being more responsive than LM. Leheska et al. (2002) failed to detect an effect of feeding finishing swine a high-protein/low-carbohydrate on meat water-holding capacity. However, in the

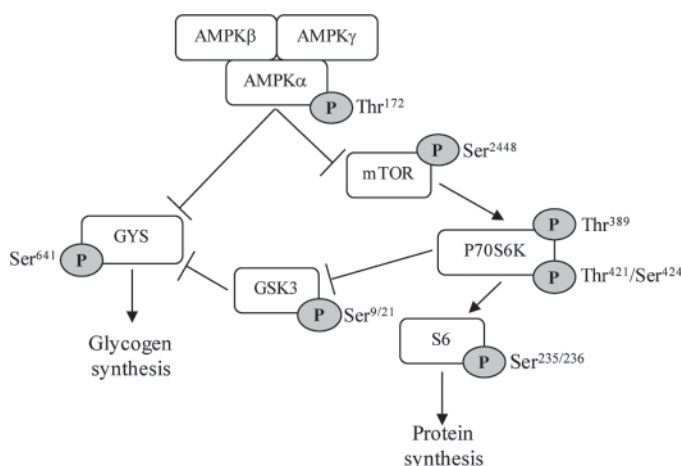


Figure 1. Functions of proteins studied in the regulation of muscle glycogen and protein synthesis. AMPK = adenosine monophosphate-activated protein kinase; GSK3 = glycogen synthase kinase; GYS = glycogen synthase; mTOR = mammalian target of rapamycin; p70S6K = p70S6 kinase; S6 = ribosomal protein S6.

Table 4. Pearson correlations between pectoralis major muscle glycolytic potential, ultimate pH, and breast meat quality measurements in the fat and lean chicken lines

Variable ¹	No. of chickens	Line	
		Fat	Lean
GP and pHu	72	-0.55***	-0.58***
pHu and L*	248	-0.51***	-0.71***
pHu and drip loss	248	-0.36**	-0.70**

¹GP = glycolytic potential measured 15 min postmortem; pHu = pH measured 24 h postmortem; L* = lightness.***P* < 0.01; ****P* < 0.001.

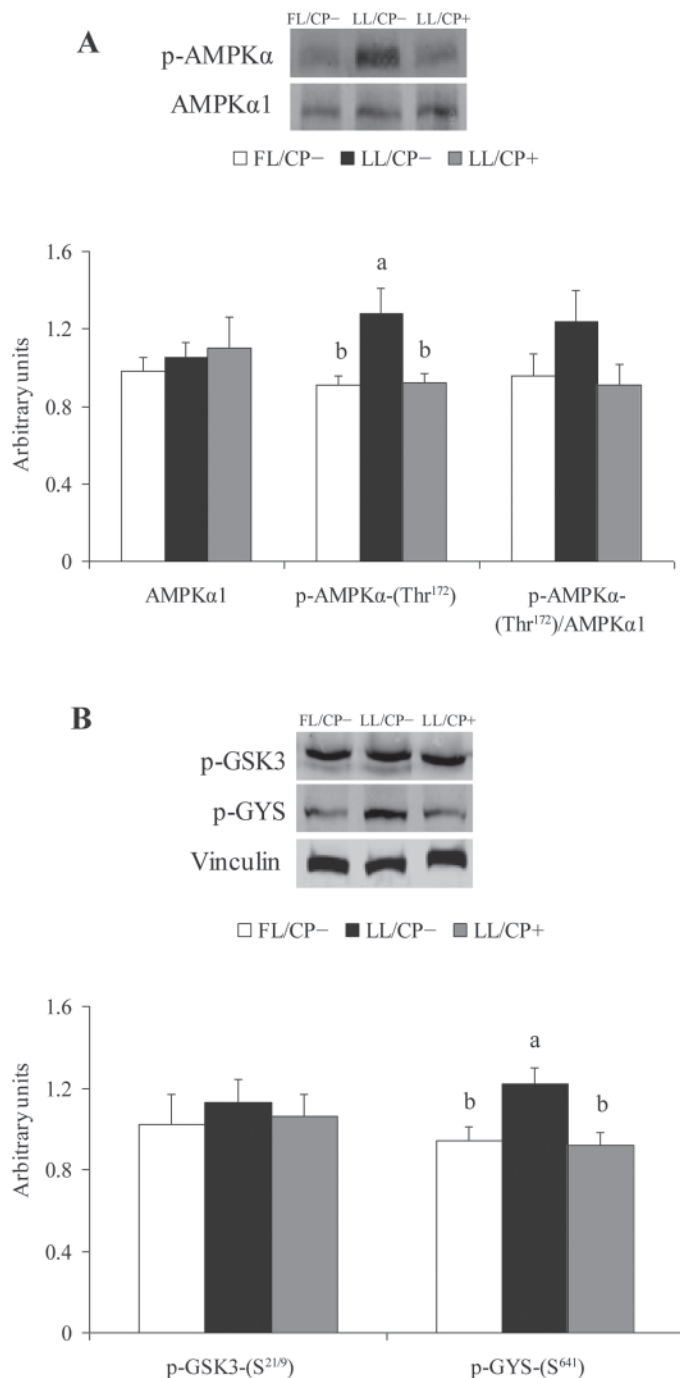


Figure 2. Characterization of A) adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), and B) glycogen synthase kinase 3 (GSK3) and glycogen synthase (GYS) in the pectoralis major muscle of lean (LL) and fat (FL) chicken lines originating from divergent selection on abdominal fatness fed either 17% (CP-) or 23% CP (CP+) diets. Representative Western blots of the pAMPKα-(Thr¹⁷²) and AMPKα1, p-GSK3-(S^{21/9}), p-GYS-(S⁶⁴¹), and vinculin. Protein extracts were prepared and subjected to Western blotting using anti-phospho-AMPKα-(Thr¹⁷²), anti-AMPKα1, anti-phospho-GSK3-(S^{21/9}), and anti-phospho-GYS-(S⁶⁴¹) antibodies. Vinculin was used as a loading control (n = 6). The results are expressed as means ± SE of the AMPKα1/vinculin, p-AMPKα-(Thr¹⁷²)/vinculin, p-AMPKα-(Thr¹⁷²)/AMPKα1, p-GSK3-(S^{21/9})/vinculin, and p-GYS-(S⁶⁴¹)/vinculin ratios (n = 6). Mean values without a common letter (a,b) differ between groups ($P \leq 0.01$).

latter study, pigs had access to the diet for only 2 to 14 d before slaughter, whereas in the other studies experimental finishing diets were given for a longer period (3 wk before slaughter). Moreover, in the Leheska et al. (2002) study, there were considerable differences in ME and feed intake between the control and high-protein diet. This resulted in impaired rates of BW gain and feed efficiency in pigs fed the high-protein/low-carbohydrate diet, which could partly explain the lack of diet effect on pork muscle quality.

In the present study, the CP+ and CP- diets were isoenergetic, and our results indicate that increasing the protein to carbohydrate ratio from 0.34 (CP-) to 0.6 (CP+) and the fat to carbohydrate ratio from 0.14 to 0.19 promotes AA use for protein accretion and energy storage as glycogen in the muscle rather than lipid deposition. This is consistent with several studies that showed that lipogenesis was impaired by high-fat/low-carbohydrate diets (Donaldson, 1985; Saadoun and Leclercq, 1987; Bradley et al., 1996; Rosebrough et al., 1999). On the other hand, the reason why FL exhibited larger amounts of glycogen in muscle than LL when fed the CP- diet might be related to their greater ability to use AA for energy production as fat (Hermier et al., 1989; Pesti et al., 1994) and probably muscle carbohydrate instead of protein synthesis.

At a molecular level, the differences in muscle glycogen content observed between treatments corresponded to differences in the phosphorylation levels of 2 major enzymes involved in glycogen turnover: the α-catalytic subunit of AMPK and GYS, which were more phosphorylated in the muscles of LL/CP- (less rich in glycogen) than in those of LL/CP+ and FL/CP-. As in mammals, chicken muscle glycogen metabolism partly results from the activity of GYS and glycogen phosphorylase. Activation of the AMPK complex stimulates glycogen phosphorylase and inhibits GYS by phosphorylation, resulting in decreased muscle glycogen storage (Carling and Hardie, 1989; Longnus et al., 2003; Jørgensen et al., 2004; Miyamoto et al., 2007). The greater content of AMPK and GYS phosphorylation observed in LL/CP- is therefore consistent with decreased muscle glycogen content and suggest a potential role for AMPK in modulating chicken muscle metabolism post-mortem through its inhibiting effects on GYS. Glycogen phosphorylase is also under the control of GSK3, but we failed to detect any regulation of this kinase in relation to variations in muscle glycogen content. Glycogen synthase kinase 3 is mainly inhibited by the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway, which is part of insulin signal transduction (Sugden et al., 2008), whereas AMPK is an energy sensor responding principally to the AMP to ATP ratio variation, as well as to energy status of muscle (Jørgensen et al., 2006). This could explain the lack of common regulation between GSK3 and AMPK, especially because the mTOR/S6K pathway, which also phosphorylates GSK3, was not affected by treatment in the current study. The postmortem control of glycolysis by AMPK

was first evidenced in pig muscle through the discovery of a mutation of the AMPK γ 3 subunit responsible for a 70% increase in muscle glycogen and the production of meat characterized by low pHu, reduced water-holding capacity, and poor processing ability (Milan et al., 2000; Andersson, 2003). The involvement of AMPK activation in modulating glycogen and postmortem metabolism in the muscle was also evidenced in several studies in the mouse (Shen and Du, 2005; Shen et al., 2005, 2008), pig (Shen et al., 2006a,b, 2007), and more recently, in chicken (Sibut et al., 2008). In this last study, AMPK activation was markedly greater in the P. major muscle of LL than in that of FL chickens. According to the present results, modulating AMPK activation in chicken muscle by nutrition is also possible, with consequences on glycogen turnover and final pH of the meat. Indeed, feeding a high-protein diet to LL chicken resulted in decreased AMPK and reduced GYS phosphorylation, and consequently increased muscle glycogen content and breast meat with low pH. In mice, dietary α -lipoic acid, which is a strong antioxidant that exists in foods, also inhibits AMPK activity in skeletal muscle (Kim et al., 2004) and results in increased pH values postmortem (Shen et al., 2005). In this last study, α -lipoic acid supplementation also decreased ADFI, growth, and body fat accumulation, whereas in the study reported here, feeding a high-protein diet to LL chickens increased BW and decreased abdominal fat deposition without affecting ADFI. These differences suggest that the consequences of modulating AMPK phosphorylation through nutrition might depend on species, genotype (present study), and general animal metabolism, with different effects on feed intake, energy storage as fat or carbohydrate, and growth rate.

Moreover, because the AMPK complex is also involved in the control of protein turnover, and therefore muscle growth (Bolster et al., 2002; Cheng et al., 2004; Koopman et al., 2006), regulation of the mTOR/p70S6K/S6 signaling pathway was explored. The mTOR activation by phosphorylation was not affected by genotype or nutrition. Moreover, no effect of treatment was observed on mTOR target p70S6K or on ribosomal S6 protein that mediates mRNA translation into proteins in muscle, suggesting that the AMPK signaling pathway could affect glycogen turnover without drastically altering the mRNA translation process. Interestingly, the mTOR protein was more abundant in LL, whether fed CP+ or CP-, than in FL. Increased *mTOR* mRNA expression has been observed in rat skeletal muscle concomitantly with increased fractional protein synthesis rate (Luo et al., 2010). Similarly, *mTOR* heterozygous mice that express reduced amounts of mTOR also exhibit decreased lean mass and muscle protein synthesis compared with wild mice (Lang et al., 2010).

By comparing 2 lines of chicken divergently selected for abdominal fatness and given diets differing in protein content, we found that muscle glycogen and breast meat quality traits can be efficiently modulated by nutrition, at least in the lean genotype. Molecular inves-

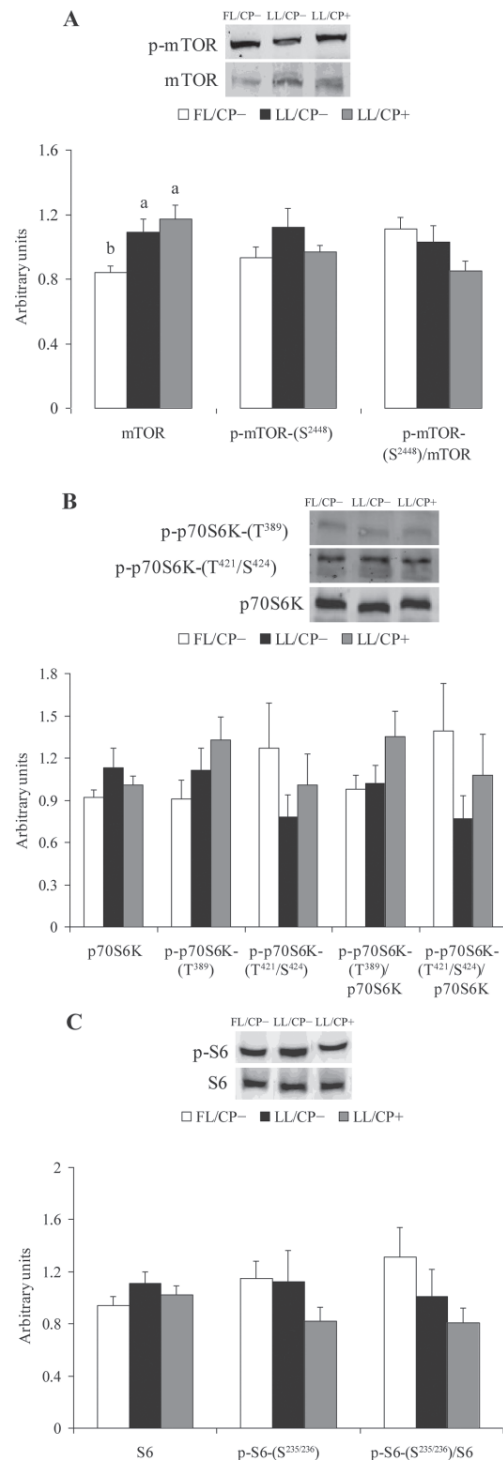


Figure 3. Characterization of A) mammalian target of rapamycin (mTOR), B) p70S6 kinase (p70S6K), and C) ribosomal protein S6 (S6) in the pectoralis major muscle of lean (LL) and fat (FL) chicken lines originating from divergent selection on abdominal fatness fed either 17% (CP-) or 23% CP (CP+) diets. Representative Western blots of the p-mTOR-(S²⁴⁴⁸), mTOR, p-p70S6K-(T³⁸⁹), p-p70S6K-(T⁴²¹/S⁴²⁴), p70S6K, p-S6-(S^{235/236}), and S6. Protein extracts were prepared and subjected to Western blotting using anti-mTOR, anti-phospho-mTOR-(S²⁴⁴⁸), anti-p70S6K, anti-phospho-p70S6K-(T³⁸⁹), anti-phospho-p70S6K-(T⁴²¹/S⁴²⁴), anti-S6, anti-phospho-S6-(S^{235/236}) antibodies. Vinculin was used as a loading control (n = 6). The results are expressed as means $\pm$ SE of the mTOR/vinculin, p-mTOR-(S²⁴⁴⁸)/vinculin, p-mTOR-(S²⁴⁴⁸)/mTOR, p70S6K/vinculin, p-p70S6K-(T³⁸⁹)/vinculin, p-p70S6K-(T³⁸⁹)/p70S6K, p-p70S6K-(T⁴²¹/S⁴²⁴)/vinculin, p-p70S6K-(T⁴²¹/S⁴²⁴)/p70S6K, S6/vinculin, p-S6-(S^{235/236})/vinculin, and p-S6-(S^{235/236})/S6 ratios (n = 6). Mean values without a common letter (a,b) differ between groups ($P \leq 0.01$).

tigations strongly suggested that the greater levels of phosphorylation of the AMPK complex (as evidenced by pAMPK α) in the lean genotype fed the low-protein diet might trigger a decreased rate of glycogen synthesis by inactivating GYS activity, and thus resulting in a decreased muscle glycogen at death and increased pHu of the meat. Our results confirm that AMPK can be a target to control muscle metabolism postmortem and meat quality in chickens while demonstrating that it is essential to understand how diet composition affects intermediate metabolism and energy distribution in the body.

LITERATURE CITED

- Alleman, F., J. Michel, A. M. Chagneau, and B. Leclercq. 2000. The effects of dietary protein independent of essential amino acids on growth and body composition in genetically lean and fat chickens. *Br. Poult. Sci.* 41:214–218.
- Andersson, L. 2003. Identification and characterization of AMPK γ 3 mutations in the pig. *Biochem. Soc. Trans.* 31:232–235.
- Bartov, I., and I. Plavnik. 1998. Moderate excess of dietary protein increases breast meat yield of broiler chicks. *Poult. Sci.* 77:680–688.
- Bee, G., C. Biolley, G. Guex, W. Herzog, S. M. Lonergan, and E. Huff-Lonergan. 2006. Effects of available dietary carbohydrate and preslaughter treatment on glycolytic potential, protein degradation, and quality traits of pig muscles. *J. Anim. Sci.* 84:191–203.
- Berri, C., J. Besnard, and C. Relandeau. 2008. Increasing dietary lysine increases final pH and decreases drip loss of broiler breast meat. *Poult. Sci.* 87:480–484.
- Berri, C., M. Debut, V. Santé-Lhoutellier, C. Arnould, B. Boutten, N. Sellier, E. Baéza, N. Jehl, Y. Jégo, M. J. Duclos, and E. Le Bihan-Duval. 2005. Variations in chicken breast meat quality: Implications of struggle and muscle glycogen content at death. *Br. Poult. Sci.* 46:572–579.
- Berri, C., E. Le Bihan-Duval, M. Debut, V. Santé-Lhoutellier, E. Baéza, V. Brunel, Y. Jégo, and M. Duclos. 2007. Consequence of muscle hypertrophy on Pectoralis major characteristics and breast meat quality of broiler chickens. *J. Anim. Sci.* 85:2005–2011.
- Berri, C., N. Wacrenier, N. Millet, and E. Le Bihan-Duval. 2001. Effects of selection for improved body composition on muscle and meat characteristics of broilers from experimental and commercial lines. *Poult. Sci.* 80:833–838.
- Bolster, D. R., S. J. Crozier, S. R. Kimball, and L. S. Jefferson. 2002. AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down regulated mTOR signaling. *J. Biol. Chem.* 277:23977–23980.
- Bradley, F., H. Gartner, T. Charron, and K. A. Chesnut. 1996. Alterations in nutritional status regulates acetyl-CoA carboxylase expression in avian liver by a transcriptional mechanism. *J. Biochem.* 319:263–268.
- Carling, D., and D. G. Hardie. 1989. The substrate and sequence specificity of the AMP-activated protein kinase. Phosphorylation of glycogen synthase and phosphorylase kinase. *Biochim. Biophys. Acta* 1012:81–86.
- Cheng, S. W., L. G. Fryer, D. Carling, and P. R. Shepherd. 2004. Thr2446 is a novel mammalian target of rapamycin (mTOR) phosphorylation site regulated by nutrient status. *J. Biol. Chem.* 279:15719–15722.
- Dalrymple, R. H., and R. Hamm. 1973. A method for the extraction of glycogen and metabolites from a single muscle sample. *J. Food Technol.* 8:439–444.
- Deschepper, K., and G. De Grotte. 1995. Effect of dietary protein, essential and non-essential amino acids on the performance and carcass composition of male broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 36:229–245.
- Donaldson, W. E. 1985. Lipogenesis and body fat in chicks: Effects of calorie-protein ratio and dietary fat. *Poult. Sci.* 64:1199–1204.
- Duchêne, S., E. Audouin, C. Berri, J. Dupont, and S. Tesseraud. 2008a. Tissue-specific regulation of S6K1 by insulin in chickens divergently selected for growth. *Gen. Comp. Endocrinol.* 156:190–198.
- Duchêne, S., S. Metayer, E. Audouin, K. Bigot, J. Dupont, and S. Tesseraud. 2008b. Refeeding and insulin activate the Akt/p70S6 kinase pathway without affecting IRS1 tyrosine phosphorylation in chicken muscle. *Domest. Anim. Endocrinol.* 34:1–13.
- Fancher, B. I., and L. S. Jensen. 1989a. Dietary protein level and essential amino acid content: Influence upon female broiler performance during the grower period. *Poult. Sci.* 68:897–908.
- Fancher, B. I., and L. S. Jensen. 1989b. Male broiler performance during the starting and growing periods as affected by dietary protein, essential amino acids, and potassium levels. *Poult. Sci.* 68:1385–1395.
- Hermier, D., A. Quignard-Boulangé, I. Dugail, G. Guy, M. R. Salichon, L. Brigant, B. Ardouin, and B. Leclercq. 1989. Evidence of enhanced storage capacity in adipose tissue of genetically fat chickens. *J. Nutr.* 119:1369–1375.
- Jørgensen, S. B., J. N. Nielsen, J. B. Birk, G. S. Olsen, B. Viollet, F. Andreelli, P. Schjerling, S. Vaulont, D. G. Hardie, B. F. Hansen, E. A. Richter, and J. F. Wojtaszewski. 2004. The α 2-5'AMP-activated protein kinase is a site 2 glycogen synthase kinase in skeletal muscle and is responsive to glucose loading. *Diabetes* 53:3074–3081.
- Jørgensen, S. B., E. A. Richter, and J. F. Wojtaszewski. 2006. Role of AMPK in skeletal muscle metabolic regulation and adaptation in relation to exercise. *J. Physiol.* 574:17–31.
- Kim, M. S., J. Y. Park, C. Namkoong, P. G. Jang, J. W. Ryu, H. S. Song, J. Y. Yun, I. S. Namgoong, J. Ha, I. S. Park, I. K. Lee, B. Viollet, J. H. Youn, H. K. Lee, and K. U. Lee. 2004. Anti-obesity effects of alpha-lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.* 10:727–733.
- Koopman, R., A. H. G. Zornec, R. J. J. Gransier, D. Cameron-Smith, and L. J. C. van Loon. 2006. Increase in S6K1 phosphorylation in human skeletal muscle following resistance exercise occurs mainly in type II muscle fibers. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290:E1245–E1252.
- Lang, C. H., R. A. Frost, S. K. Bronson, J. L. Christopher, and T. C. Vary. 2010. Skeletal muscle protein balance in mTOR heterozygous mice in response to inflammation and leucine. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298:E1283–E1294.
- Le Bihan-Duval, E., C. Berri, E. Baéza, N. Millet, and C. Beaumont. 2001. Estimation of the genetics parameters of meat characteristics and of their genetic correlations with growth and body composition in an experimental broiler line. *Poult. Sci.* 80:839–843.
- Le Bihan-Duval, E., M. Debut, C. Berri, N. Sellier, V. Santé-Lhoutellier, Y. Jégo, and C. Beaumont. 2008. Chicken meat quality: Genetic variability and relationship with growth and muscle characteristics. *BMC Genet.* 9:53.
- Leclercq, B., J. C. Blum, and J. P. Boyer. 1980. Selecting broilers for low or high abdominal fat: Initial observations. *Br. Poult. Sci.* 21:107–113.
- Leheska, J. M., D. M. Wulf, J. A. Clapper, R. C. Thaler, and R. J. Maddock. 2002. Effects of high-protein/low-carbohydrate swine diets during the final finishing phase on pork muscle quality. *J. Anim. Sci.* 80:137–142.
- Longnus, S. L., R. B. Wambolt, H. L. Parsons, R. W. Brownsey, and M. F. Allard. 2003. 5-aminoimidazole-4-carboxamide 1-beta-D-ribofuranoside (AICAR) stimulates myocardial glycogenolysis

- by allosteric mechanisms. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284:R936–R944.
- Luo, J., D. Chen, and B. Yu. 2010. Effects of different dietary sources on expression of genes related to protein metabolism in growing rats. *Br. J. Nutr.* 104:1421–1428.
- Milan, D., J. T. Jeon, C. Looft, V. Amarger, A. Robic, M. Thelander, C. Rogel-Gaillard, S. Paul, N. Iannuccelli, L. Rask, H. Ronne, K. Lundström, N. Reinsch, J. Gellin, E. Kalm, P. Le Roy, P. Chardon, and L. Andersson. 2000. A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. *Science* 288:1248–1251.
- Miyamoto, L., T. Toyoda, T. Hayashi, S. Yonemitsu, M. Nakano, S. Tanaka, K. Ebihara, H. Masuzaki, K. Hosoda, Y. Ogawa, G. Inoue, T. Fushiki, and K. Nakao. 2007. Effect of acute activation of 5'-AMP-activated protein kinase on glycogen regulation in isolated rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 102:1007–1013.
- Monin, G., and P. Sellier. 1985. Pork of low technological quality with a normal rate of muscle pH fall in the immediate post-mortem period: The case of the Hampshire breed. *Meat Sci.* 13:49–63.
- Morris, T. R., and D. M. Njuru. 1990. Protein requirement of fast- and slow-growing chicks. *Br. Poult. Sci.* 31:803–810.
- Pesti, G. M., B. Leclercq, A. M. Chagneau, and T. Cochard. 1994. Comparative responses of genetically lean and fat chickens to lysine, arginine and non-essential amino acid supply. II. Plasma amino acid responses. *Br. Poult. Sci.* 35:697–707.
- Rosebrough, R. W., J. P. Mcmurtry, and R. Vasilatos-Younken. 1999. Dietary fat and protein interactions in the broiler. *Poult. Sci.* 78:992–998.
- Rosenvold, K., B. Essén-Gustavsson, and H. J. Andersen. 2003. Dietary manipulation of pro- and macroglycogen in porcine skeletal muscle. *J. Anim. Sci.* 81:130–134.
- Rosenvold, K., H. N. Lærke, S. K. Jensen, A. Karlsson, L. Lundström, and H. J. Andersen. 2002. Manipulation of critical quality indicators and attributes in pork through vitamin E supplementation, muscle glycogen reducing finishing feeding and pre-slaughter stress. *Meat Sci.* 62:485–496.
- Rosenvold, K., J. S. Petersen, H. N. Lærke, S. K. Jensen, M. Therkildsen, A. H. Karlsson, H. S. Møller, and H. J. Andersen. 2001. Muscle glycogen stores and meat quality as affected by strategic finishing feeding of slaughter pigs. *J. Anim. Sci.* 79:382–391.
- Saadoun, A., and B. Leclercq. 1987. In vivo lipogenesis of genetically lean and fat chickens: Effects of nutritional state and dietary fat. *J. Nutr.* 117:428–435.
- Shen, Q. W., and M. Du. 2005. Role of AMP-activated protein kinase in the glycolysis of postmortem muscle. *J. Sci. Food Agric.* 85:2401–2406.
- Shen, Q. W., D. E. Gerrard, and M. Du. 2008. Compound C, an inhibitor of AMP-activated protein kinase, inhibits glycolysis in mouse longissimus dorsi post-mortem. *Meat Sci.* 78:323–330.
- Shen, Q. W., C. S. Jones, N. Kalchayanand, M. J. Zhu, and M. Du. 2005. Effect of dietary alpha-lipoic acid on growth, body composition, muscle pH, and AMP-activated protein kinase phosphorylation in mice. *J. Anim. Sci.* 83:2611–2617.
- Shen, Q. W., W. J. Means, S. A. Thompson, K. R. Underwood, M. J. Zhu, R. J. McCormick, S. P. Ford, and M. Du. 2006a. Pre-slaughter transport, AMP-activated protein kinase, glycolysis, and quality of pork loin. *Meat Sci.* 74:388–395.
- Shen, Q. W., W. J. Means, K. R. Underwood, S. A. Thompson, M. J. Zhu, R. J. McCormick, S. P. Ford, M. Ellis, and M. Du. 2006b. Early post-mortem AMP-activated protein kinase (AMPK) activation leads to phosphofructokinase-2 and -1 (PFK-2 and PFK-1) phosphorylation and the development of pale, soft, and exudative (PSE) conditions in porcine longissimus muscle. *J. Agric. Food Chem.* 54:5583–5589.
- Shen, Q. W., K. R. Underwood, W. J. Means, R. J. McCormick, and M. Du. 2007. The halothane gene, energy metabolism, adenosine monophosphate-activated protein kinase, and glycolysis in post-mortem pig longissimus dorsi muscle. *J. Anim. Sci.* 85:1054–1061.
- Sibut, V., C. Hennequet-Antier, E. Le Bihan-Duval, S. Marthey, M. J. Duclos, and C. Berri. 2011. Identification of differentially expressed genes in chickens differing in muscle glycogen content and meat quality. *BMC Genomics* 12:112.
- Sibut, V., E. Le Bihan-Duval, S. Tesseraud, E. Godet, T. Bordeau, E. Cailleau-Audouin, P. Chartrin, M. J. Duclos, and C. Berri. 2008. AMP-activated protein kinase involved in the variations of muscle glycogen and breast meat quality between lean and fat chickens. *J. Anim. Sci.* 86:2888–2896.
- Sugden, P. H., S. J. Fuller, S. C. Weiss, and A. Clerk. 2008. Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) in the heart: A point of integration in hypertrophic signalling and a therapeutic target? A critical analysis. *Br. J. Pharmacol.* 153:S137–S153.
- Temim, S., A. M. Chagneau, S. Guillaumin, J. Michel, R. Peresson, and S. Tesseraud. 2000. Does excess dietary protein improve growth performance and carcass characteristics in heat-exposed chickens? *Poult. Sci.* 79:312–317.
- Tesseraud, S., I. Bouvarel, A. Collin, E. Audouin, S. Crochet, I. Seiliez, and C. Leterrier. 2009. Daily variations in dietary lysine content alter the expression of genes related to proteolysis in chicken pectoralis major muscle. *J. Nutr.* 139:38–43.
- Tesseraud, S., S. Métayer, S. Duchêne, K. Bigot, J. Grizard, and J. Dupont. 2007. Regulation of protein metabolism by insulin: Value of different approaches and animals models. *Domest. Anim. Endocrinol.* 33:123–142.
- Widiyaratne, G. P., and M. D. Drew. 2011. Effects of protein level and digestibility on the growth and carcass characteristics of broiler chickens. *Poult. Sci.* 90:595–603.
- Yalçın, S., H. Özkul, S. Öskan, R. Gous, I. Yaşa, and E. Babacanoglu. 2010. Effect of dietary protein regime on meat quality traits and carcass nutrient content of broilers from two commercial genotypes. *Br. Poult. Sci.* 51:621–628.
- Ylä-Ajos, M., M. Ruusunen, and E. Puolanne. 2007. Glycogen debranching enzyme and some other factors relating to post-mortem pH decrease in poultry muscles. *J. Sci. Food Agric.* 87:394–398.

I. 4. Discussion

I.4.1. Principales caractéristiques des deux lignées étudiées

Notre étude a été menée sur des poulets issus de deux lignées : la lignée maigre (LL pour Lean line) et la lignée grasse (FL pour Fat line) qui ont été sélectionnées de manière divergente sur l'engraissement abdominal à l'Unité de Recherches Avicoles de Tours par Leclercq et al. (1980).

Plusieurs études ont été menées sur ces deux lignées afin de déterminer les caractéristiques corporelles et métaboliques de chaque lignée (Alleman et al., 1999 ; Bourneuf et al., 2006). Les poulets génétiquement maigres ont tendance à consommer moins d'aliment que les poulets génétiquement gras (Leclercq, 1983 ; Geraert et al 1990). Cependant, cette différence est relativement faible et parfois non significative. A l'âge de 9 semaines, les poids vifs et les rendements en filet sont différents entre les deux génotypes : le poids vif est inférieur et la proportion de muscles pectoraux (le rendement en filet) est supérieure chez la lignée maigre par rapport à la lignée grasse (Ricard et al., 1983 ; Sibut et al., 2008). Dans le cadre d'un régime équilibré, les poulets issus de la lignée grasse présentent un engraissement abdominal environ 3 fois supérieur à celui des poulets de la lignée maigre. Les teneurs du muscle pectoral en lipides demeurent cependant similaires entre les deux génotypes (Sibut et al., 2008), alors qu'au niveau de la cuisse, les dépôts adipeux (intermusculaires et sous-cutanés) sont affectés par la sélection (FL > LL, Ricard et al., 1983).

Le métabolisme protéique est modifié par la sélection. Ainsi, les poulets gras montrent une efficacité de rétention des protéines alimentaires inférieure à celle des poulets maigres (Alleman et al., 1999). Une incorporation plus intense du carbone de l'alanine dans les lipides a été observée chez les poulets de la lignée grasse suggérant une utilisation supérieure des acides aminés à des fins énergétiques dans cette lignée. Pour le même aliment, les poulets maigres présentent un rapport entre protéines déposées et protéines ingérées plus élevé que les poulets gras (Leclercq, 1983 ; Geraert et al., 1990). En revanche, les poulets de la lignée maigre exigent des régimes plus riches en protéines et en acides aminés (essentiels et non essentiels). Ils sont plus sensibles à une carence en protéines et en acides aminés que les poulets de la lignée grasse (Leclercq, 1983).

Table 14 : Caractéristiques corporelles et du muscle P. major des lignées expérimentales maigres (Lean Line) et grasses (Fat Line) (d'après Sibut et al., 2008)

Item ²	No. of chickens	Lean line	Fat line	Level of significance
BW, g	60	2.522 ± 25	2.627 ± 21	***
Breast yield, % of BW	60	12.76 ± 0.12	11.51 ± 0.12	***
Abdominal fat weight, g	60	35.7 ± 1.74	103.5 ± 2.79	***
Abdominal fat yield, % of BW	60	1.40 ± 0.06	3.93 ± 0.09	***
Pectoralis major muscle traits				
Lipid content, %	12	0.95 ± 0.04	0.83 ± 0.04	NS
Glycogen, $\mu M/g$	12	15.0 ± 3.0	26.4 ± 3.0	*
GP, $\mu M/g$	12	93.6 ± 5.1	111.6 ± 3.8	**
pHu	60	5.79 ± 0.01	5.66 ± 0.01	***
L*	60	44.8 ± 0.3	47.4 ± 0.3	***
a*	60	-0.28 ± 0.09	-1.01 ± 0.09	***
b*	60	9.31 ± 0.13	8.29 ± 0.17	***
Drip loss, ³ %	60	1.12 ± 0.07	1.35 ± 0.08	*

¹Data presented as means ± SE.

²GP = muscle glycolytic potential; pHu = muscle pH 24 h postmortem; L*, a*, and b* = lightness, redness, and yellowness, respectively, at 24 h postmortem.

³Drip loss is expressed as a percentage of pectoralis major muscle weight at 24 h.

NS = nonsignificant; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

En comparaison avec les poulets de la lignée grasse, les poulets maigres se caractérisent par une glycémie plus élevée suggérant une utilisation moins importante du glucose confirmant les tests de tolérance au glucose ou les tests de sensibilité à l'insuline (Simon et Leclercq, 1982). Au niveau du muscle P. major du filet, le potentiel glycolytique (PG) est supérieur chez les poulets gras suggérant que ces animaux stockent plus de glycogène dans le muscle que les poulets maigres. En lien avec ce différentiel, les poulets gras produisent un filet caractérisé par un pH ultime plus acide, une couleur plus pâle et des pertes en eau supérieures au cours du stockage (Sibut et al., 2008). Le tableau 14 (issu de Sibut et al., 2008) résume quelques unes des caractéristiques des lignées maigre et grasse.

I.4.2. Mécanismes moléculaires impliqués dans les variations de qualité des viandes

Le modèle des lignées maigre et grasse a été à la base de plusieurs études fonctionnelles pour identifier les gènes et/ou voies métaboliques impliquées dans les variations de qualité des viandes chez le poulet en lien avec les variations de glycogène musculaire. Plusieurs expériences ont été conduites incluant des approches ciblées au niveau de l'expression génique et de la signalisation protéique et des approches globales d'analyse du transcriptome musculaire.

Le complexe AMPK a été étudié en priorité du fait de son rôle pivot dans le contrôle de la balance énergétique du muscle, notamment concernant le turnover du glycogène. Par ailleurs, chez le porc, son rôle dans le contrôle du pH ultime et de la qualité de la viande a été démontré au travers de la découverte du gène majeur RN (Rendement Napole). Dans ce cas une mutation dans le gène PRKAG3 codant pour la sous-unité régulatrice $\gamma 3$ du complexe AMPK entraîne une augmentation significative du glycogène musculaire et une dégradation consécutive des rendements technologiques (ou rendement Napole) de la viande de porc (Milan et al., 2000). Chez le poulet, le séquençage du gène PRKAG3 ne semble pas indiquer l'implication d'un polymorphisme particulier dans le contrôle des réserves en glycogène et le pH ultime du muscle (communication personnelle F. Pitel, INRA-LGC, Toulouse). Pour autant, la comparaison des lignées maigre et grasse a révélé une augmentation de l'expression du gène codant pour la sous-unité $\gamma 2$ au détriment de celui codant pour la sous-unité $\gamma 1$ du

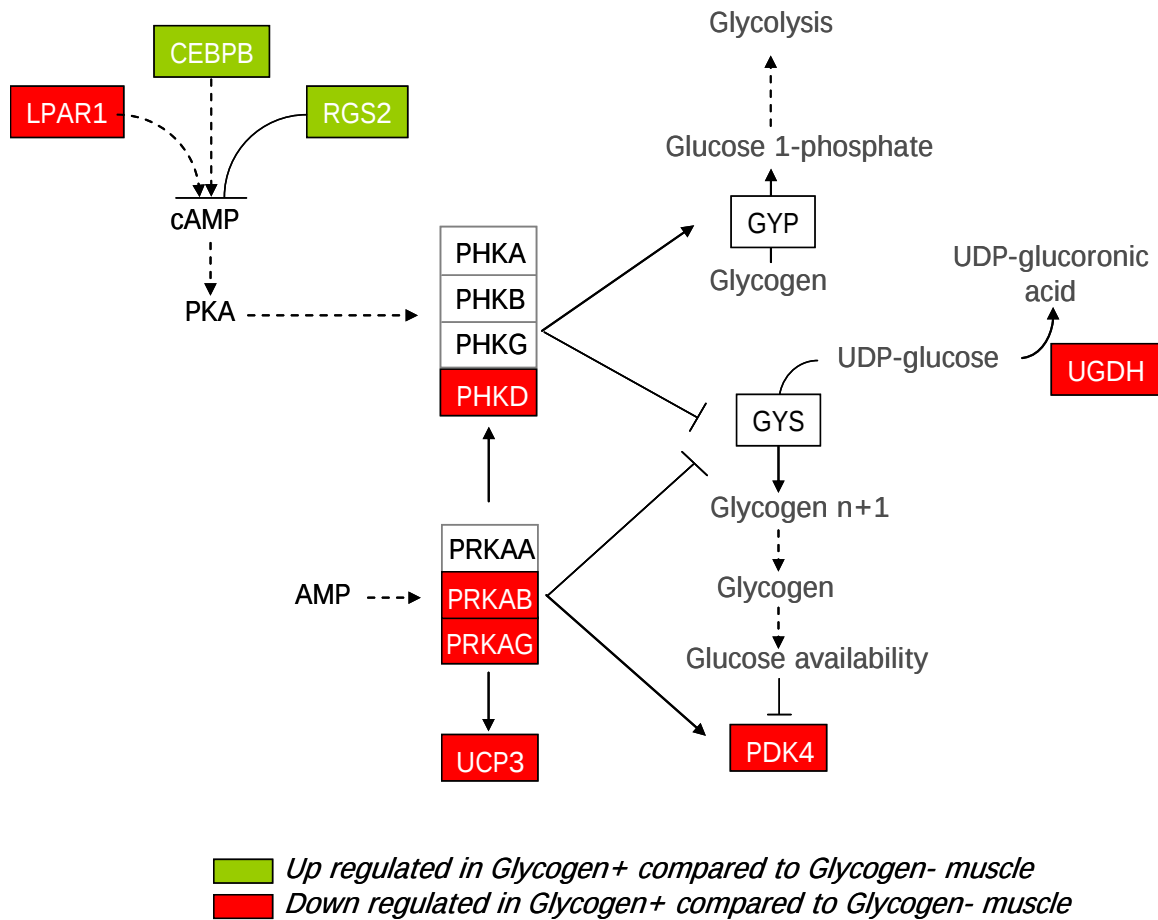


Figure 25. Schéma des voies potentiellement impliquées dans le contrôle du glycogène musculaire chez le poulet. Résultats de la comparaison du transcriptome musculaire de poulets issus d'un croisement F2 entre poulet maigre et gras et présentant des réserves en glycogène élevées (Glycogen +) ou faibles (Glycogen -) (d'après Sibut et al., 2011).

CEBPB, CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta ; GYS, Glycogen synthase; GYP, Glycogen phosphorylase ; LPAR1, Lysophosphatidic acid receptor 1 ; PDK4, Pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4 ; PHKA, B, G, D: Phosphorylase kinase, alpha, beta, gamma, delta; PKA, Protein kinase A ; PRKAA, B, G, AMP-activated protein kinase, alpha, beta, gamma ; UGDH, UDP-glucose dehydrogenase ; RGS2, Regulator of G-protein signaling 2 ; UCP3, Uncoupling protein 3 (équivalent humain de avUCP).

complexe AMPK (Sibut et al., 2008), qui pourrait conférer au complexe de l'AMPK une sensibilité plus importante à l'AMP (Cheung et al., 2000). Cette hypothèse est d'ailleurs cohérente avec les niveaux d'activation par phosphorylation de la sous-unité catalytique α qui sont 3 fois plus élevés chez les poulets maigres que chez les poulets gras (Sibut et al., 2008). Une surexpression des gènes codant pour la glycogène synthase (GYS) et la glycogène phosphorylase (PYG), signe éventuel d'un turnover plus rapide du glycogène, a aussi été observé dans le muscle des poulets maigres par rapport aux poulets gras.

L'analyse du transcriptome d'animaux issus d'un croisement de type F2 entre les lignées maigre et grasse a confirmé l'implication du complexe AMPK et a suggéré l'intervention d'autres acteurs moléculaires dans le contrôle du glycogène musculaire et de la qualité des viandes chez le poulet (Sibut et al., 2011). Parmi ceux-ci, des facteurs de transcription (CEBPB et RGS2) à travers leur rôle régulateur de la voie de signalisation cAMP-dépendante, PDK4 en tant que senseur du glycogène et UGDH par son rôle dans l'utilisation de l'UDP-glucose (Figure 25).

Notre étude a focalisé sur le rôle du complexe AMPK et notamment sur la possibilité de moduler son activité *via* l'alimentation. Nos principaux objectifs étaient les suivants :

- étudier la possibilité de moduler les réserves en glycogène du muscle *via* un apport alimentaire variable en protéines,
- définir les éventuelles interactions avec les caractéristiques corporelles et les besoins des animaux.
- valider l'implication de l'AMPK dans le contrôle des réserves en glycogène musculaire et la cinétique de chute de pH *post-mortem*,
- évaluer les conséquences sur l'activation de certaines cibles de l'AMPK comme GYS qui régule la synthèse du glycogène ou mTOR qui active la voie p70S6K/S6 impliquée dans le processus de traduction des ARN messagers en protéines.

I.4.3. Apport de notre étude dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle de la teneur en glycogène du muscle

Le premier résultat significatif de notre étude a été de montrer que l'apport alimentaire en protéines pouvait moduler la teneur en glycogène du muscle (estimé au travers du PG) et la qualité technologique du filet chez le poulet. Cet effet dépend toutefois du type d'animal. Ainsi, dans notre comparaison seul le génotype maigre répond à l'apport en protéines en ce qui concerne les réserves en glycogène musculaire et la qualité de la viande (Tableau 3 de l'article). Ce résultat est particulièrement intéressant sachant que pour les autres caractères de production, tels que le poids vif à l'abattage, les rendements en filet ou encore l'engraissement abdominal, l'effet de l'apport en protéine n'interagit pas avec le génotype (Tableau 2 de l'article). Comme mentionné précédemment, plusieurs études indiquent l'existence de liens respectivement positif et négatif entre le PG du muscle pectoral et l'adiposité ou le rendement en filet chez le poulet. Notre hypothèse initiale était donc qu'un apport accru en protéines en induisant une réduction de l'adiposité des animaux et une augmentation de leur rendement en muscle puisse être associé à une réduction du PG du filet. Or, c'est l'inverse qui a été observé, puisque les animaux maigres (LL) recevant la ration enrichie en protéines (CP+) présentaient une carcasse mieux conformée (ratio filet/gras abdominal supérieur) et un PG du muscle pectoral supérieur à celui des animaux maigres recevant le régime moins riche en protéines (CP-). Il apparaît donc que le lien existant entre adiposité et PG du muscle pectoral soit plus complexe et doive se raisonner à plusieurs niveaux. Ainsi, notre étude confirme que la mise en réserve d'énergie sous forme de glycogène dans le muscle dépendrait de la capacité intrinsèque des animaux à stocker de l'énergie (sous forme de gras ou de glycogène musculaire) au détriment de la synthèse protéique musculaire (cas des poulets gras par rapport aux poulets maigres, par exemple). Nos résultats suggèrent donc que la régulation du PG va dépendre du métabolisme intermédiaire des animaux qui en fonction des apports alimentaires détermine la répartition énergétique et au final la balance croissance protéique/stockage d'énergie de l'animal.

Les résultats obtenus au niveau moléculaire confortent cette hypothèse. En effet, le complexe AMPK semble bien impliqué dans le contrôle du turnover du glycogène *via* notamment l'inhibition par phosphorylation de GYS au niveau du muscle. Or l'AMPK est connue pour

être un détecteur de l'état énergétique de la cellule et jouer un rôle clé dans la régulation du métabolisme. Ainsi, en réponse à une déplétion énergétique cellulaire, l'AMPK active les voies métaboliques qui produisent de l'énergie (oxydation des acides gras par exemple) et inhibe celles qui en consomment (lipogenèse, néoglucogenèse). A l'échelle de l'organisme, l'AMPK est un régulateur majeur de l'homéostasie énergétique, puisqu'en intégrant au niveau hypothalamique des signaux hormonaux et nutritionnels elle participe à la coordination de la prise alimentaire et de la dépense énergétique.

Dans la présente étude, les poulets maigres recevant le régime pauvre en protéines (LL/CP-) se caractérisent par des niveaux de phosphorylation plus élevés de l'AMPK et de GYS, correspondant respectivement à une activation et une inhibition de ces deux enzymes. Cette réponse pourrait correspondre à un état de déplétion énergétique qui aurait pour conséquence d'activer les voies qui produisent de l'énergie et d'inhiber celles qui en consomment (comme la synthèse et la mise en réserve du glycogène, par exemple). Le fait que cette réponse ne soit pas observée chez le génotype gras pourrait être lié à certaines de leurs caractéristiques par rapport aux poulets maigres, comme :

- une utilisation supérieure des acides aminés à des fins énergétiques,
- une sensibilité moindre à une carence en protéines et en acides aminés,
- une utilisation plus importante du glucose.

Les résultats de notre étude n'indiquent pas que la régulation de l'activité AMPK par la génétique ou l'alimentation affecte la synthèse protéique du muscle *via* la voie de signalisation mTOR/p70S6K/S6. Notre étude indique cependant la possibilité chez le poulet d'un lien positif entre les niveau d'expression de la protéine mTOR dans le muscle et sa capacité à déposer des protéines, comme cela a déjà été suggéré dans des modèles mammifères (Lang et al., 2010 ; Luo et al., 2010).

I.4.4. Conclusions et perspectives

En conclusion, cette étude a permis de démontrer la possibilité chez le poulet de moduler le glycogène musculaire et en conséquence la qualité technologique du filet *via* l'alimentation. Elle confirme que dans cette espèce, l'AMPK constitue un acteur clef qui en fonction des besoins et des apports de l'animal régule le turnover du glycogène au niveau de la cellule

musculaire. Elle ouvre de ce fait des perspectives d'études intéressantes pour mieux comprendre les lois de réponse du métabolisme énergétique musculaire en fonction de l'apport alimentaire et des besoins propres ou du statut énergétique des animaux. Ainsi, l'étude de la régulation par les nutriments de l'AMPK et de la synthèse du glycogène *in vitro* pourrait permettre d'explorer des pistes d'innovation intéressantes en termes de stratégie alimentaire pour optimiser la qualité technologique des viandes. Actuellement au laboratoire, des expérimentations *in vivo* ont aussi été initiées afin de mieux évaluer la réponse des animaux à des apports alimentaires faisant varier à la fois la teneur de l'aliment en protéines mais aussi l'équilibre entre acides aminés. L'hypothèse est qu'en déséquilibrant l'apport en certains acides aminés promoteurs de la synthèse protéine, la lysine par exemple, on affecte l'utilisation de l'énergie notamment à des fins de stockage (gras, glycogène). Les premiers résultats indiquent d'ailleurs qu'une carence en lysine dans le cadre d'un régime au contraire riche en autres acides aminés conduit à l'obtention de viandes acides suggérant un stockage plus important du glycogène dans un muscle où la synthèse protéique est limitée par les faibles apports en lysine.

La possibilité d'optimiser la qualité des viande de volaille en orientant le métabolisme intermédiaire des poulets *via* l'alimentation et donc envisageable en volaille même si les résultats de notre étude souligne la nécessité de prendre en compte les caractéristiques intrinsèques des animaux dont vont dépendre les seuils de réponse aux variations alimentaires. La confirmation que l'AMPK serait un biomarqueur pertinent de la qualité technologique des viandes de volaille est un atout pour le développement de futures études qui permettront à terme de proposer des stratégies de production (génétique ou élevage) optimisant la qualité de la production avicole de chair.

VOLET 2 : Régulation du métabolisme des caroténoïdes et conséquence pour la coloration de la viande

II.1. Introduction

Quelle que soit l'espèce, la couleur de la viande constitue un facteur de qualité important pour le consommateur. C'est en effet la couleur qui va orienter l'acte d'achat puisque la plupart des autres caractéristiques de qualité ne peut être évaluée facilement par le consommateur. Concernant les viandes rouges (bovines et ovines), ce sont principalement les variations de couleur liées à l'état chimique (plus ou moins oxydé) des pigments héminiques (hémoglobine, myoglobine) qui vont être prises en compte par le consommateur. Ceci explique d'ailleurs l'importance accordée aux technologies de packaging utilisant des atmosphères modifiées dans ces filières. Dans le cas des viandes blanches (porc, poulet, dinde), la teneur en pigments héminiques est beaucoup plus faibles et les modifications de leur état chimique au cours du stockage ont une incidence plus restreinte sur l'aspect de la viande. Dans le cas des viandes blanches, les variations de coloration sont plutôt liées aux variations de pH *post-mortem* mais aussi à l'apport de certains pigments *via* l'alimentation. Dans le cas du filet de poulet, il est maintenant bien établi que la luminance (ou clarté) de la viande dépend essentiellement du pH *post-mortem* qui influence la structure musculaire et par conséquent l'absorption et la diffusion de la lumière incidente. L'intensité de la coloration est elle dépendante de plusieurs facteurs. L'indice de rouge est ainsi relié à la teneur en pigments héminiques (Berri et al., 2001) mais aussi à l'activité des animaux juste avant leur mort qui provoque un afflu de sang dans le muscle (Berri et al., 2005). Les indices de rouge et de jaune sont par ailleurs influencés par la quantité et la qualité de certains micronutriments liposolubles, comme les pigments caroténoïdes, qui sont contenus dans l'alimentation et qui s'accumulent dans les tissus, dont le muscle squelettique.

Tout comme l'ensemble des animaux, les volailles sont incapables de synthétiser les pigments caroténoïdes ; elles doivent se les procurer à partir de l'alimentation. Par la suite, ces métabolites sont absorbés au niveau des cellules intestinales, clivés puis transportés dans les

Tableau 15 : Caractéristiques des lignées HG et LG et de leur croisement de type F2 abattus à l'âge de 9 semaines (d'après Nadaf et al., 2007).

	HG	LG	P-value	F2
<i>Chickens (n)</i>	53	56		698
<i>Growth and body composition</i>				
Body Weight (g)	1922 ± 157	683 ± 67	<.0001	1127 ± 185
Abdominal Fat	2.5 ± 0.7	0.2 ± 0.2	<.0001	1.6 ± 0.9
Breast Yield	11.4 ± 0.8	10.4 ± 0.8	<.0001	11.4 ± 0.5
<i>Breast meat quality traits</i>				
Drip loss (%)	2.3 ± 1.2	2.1 ± 1.5	ns	1.2 ± 0.7
Lightness(BCo-L)	48.3 ± 3.2	45.6 ± 1.8	<.0001	47.3 ± 2.4
Redness (BCoR)	-0.2 ± 0.8	1.6 ± 0.7	<.0001	1.0 ± 0.9
Yellowness (BCo-Y)	9.4 ± 1.2	13.3 ± 1.4	<.0001	11.7 ± 1.5
pH 15 min (pH15)	6.20 ± 0.22	6.33 ± 0.16	0.0004	6.33 ± 0.18
Ultimate pH (pHu)	5.74 ± 0.09	6.14 ± 0.14	<.0001	6.01 ± 0.15

différents organes ou tissus. L'alimentation des volailles contient naturellement des pigments xanthophylles, comme la lutéine ou la zéaxanthine, apportés par le maïs, le gluten de maïs et éventuellement d'autres matières premières comme l'alfalfa ou encore la luzerne. Les teneurs en carotènes sont en revanche beaucoup plus limitées, apportées essentiellement par le tourteau de soja, le blé ou encore la luzerne. D'ailleurs, les dosages réalisés dans le cadre de nos études montrent que l'aliment standard que nous distribuons aux poulets de chair à l'unité expérimentale PEAT (INRA, Nouzilly) contient de la lutéine et de la zéaxanthine (respectivement 2,1 et 2,7 µg par kg de matière sèche pour les régimes de la première étude) mais pas de β-carotène (en tous les cas pas à une valeur détectable). En plus de l'apport naturel par les matières premières, les aliments pour volailles peuvent être enrichis avec des pigments soit naturels soit synthétiques, l'objectif étant d'intensifier la coloration de la volaille de chair (leur peau surtout) ou du jaune d'œuf dans le cas des poules pondeuses en réponse à des préférences alimentaires (Sunde, 1992 ; Castaneda et al., 2005).

Au-delà de l'effet propre de l'alimentation sur la coloration des tissus, il existe aussi une régulation génétique. Celle-ci a été observée dans plusieurs espèces incluant les ovins, les bovins et le poulet. Chez le poulet domestique par exemple le phénotype « yellow skin » (peau jaune) est associé à un allèle récessif qui influence la quantité de caroténoïdes déposés dans la peau. Récemment, le gène BCDO2 a été identifié comme acteur moléculaire clef dans ce mécanisme (Eriksson et al., 2008). En effet plusieurs SNP au sein du gène BCDO2 ont été identifiés chez les animaux porteur de l'allèle « yellow skin » et associés à une expression réprimée de BCDO2 dans la peau favorisant une accumulation des pigments xanthophylles dans ce tissu. De même, des résultats récents montrent qu'une double-mutation fonctionnelle dans le promoteur du gène BCMO1 est impliquée dans le contrôle de la coloration jaune et rouge du filet chez le poulet suite à des modifications d'expression du gène et de teneurs en lutéine et zéaxanthine dans le muscle (Le Bihan-Duval., 2011).

II.2. Découverte de la mutation au locus BCMO1

Dans les années 60, une expérience de sélection divergente sur la courbe de croissance a été mise en place à l'URA (Ricard et al., 1975). Actuellement deux lignées extrêmes sur la croissance sont encore entretenues à l'URA : les lignées HG (High Growth) et LG (Low Growth) qui sont le résultat de 13 générations de sélection. Comme l'indique le tableau 15

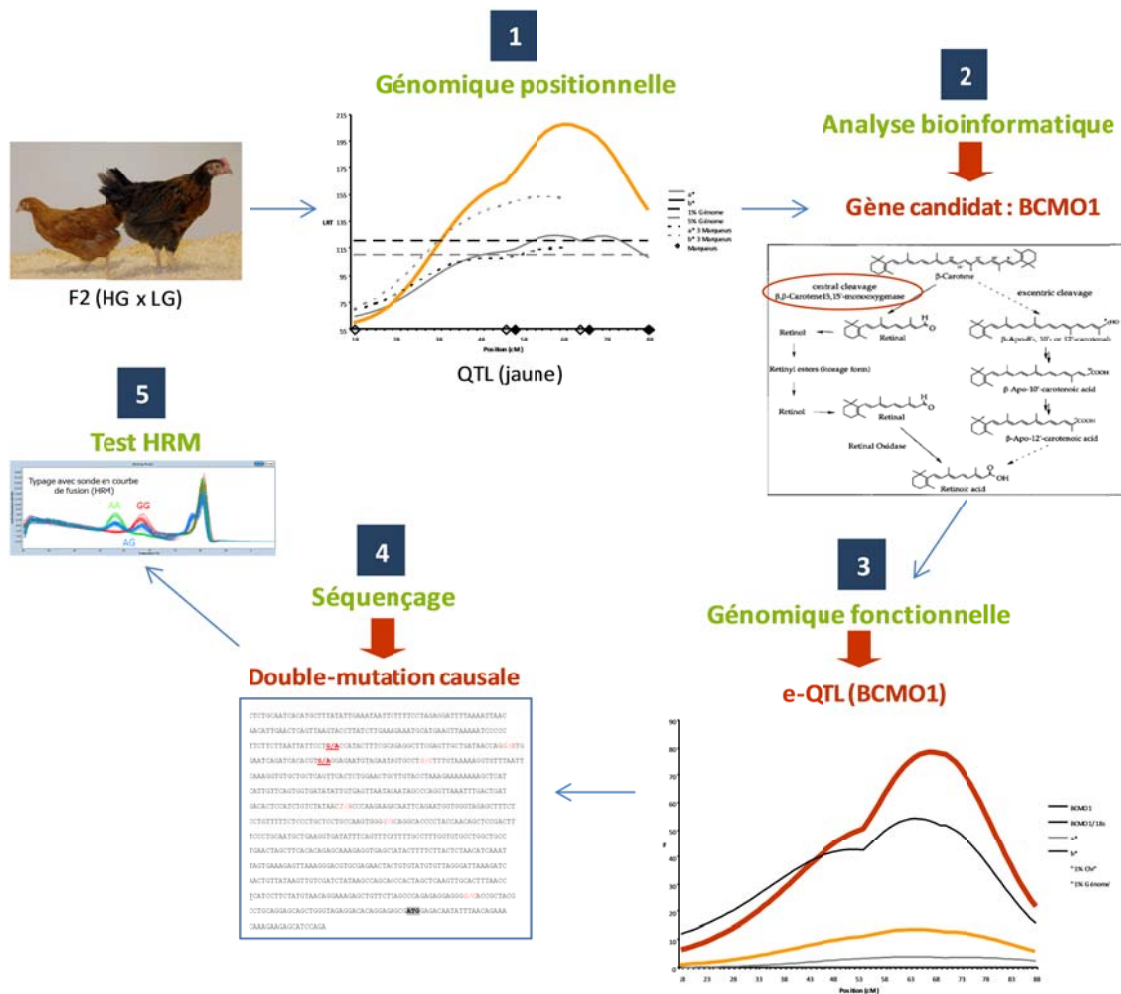


Figure 26. Principales étapes qui ont conduit à la mise en évidence de la double-mutation dans le promoteur du gène BCMO1

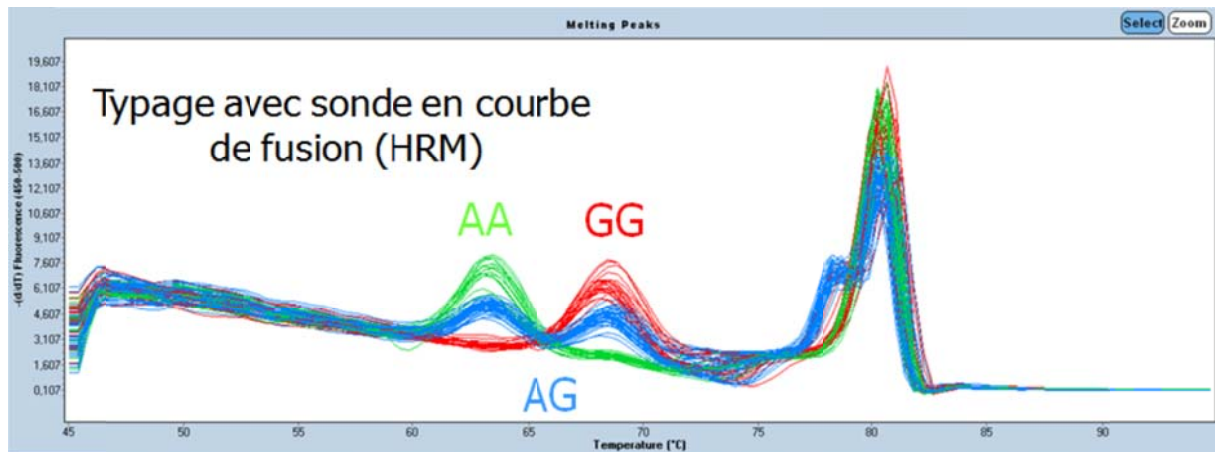
(Nadaf et al., 2007), la lignée HG se caractérise surtout par un poids vif et un pourcentage de gras abdominal à 9 semaines respectivement 2,8 et 12,5 fois supérieurs à ceux de la lignée LG. Au-delà des différences de croissance et d'adiposité, les individus LG présentent des filets nettement moins acides mais aussi beaucoup plus colorés (a* et b* supérieur) et foncés (L* inférieur) que ceux de la lignée HG.

C'est d'ailleurs en lien avec ce différentiel de couleur important qu'un QTL pour les indicateurs de coloration rouge (a*) et jaune (b*) du filet a été mis en évidence sur le chromosome GGA11 dans une population issue du croisement de type F2 entre ces deux lignées (Nadaf et al., 2007). Après affinement de la région identifiée, une analyse bioinformatique a révélé un candidat fonctionnel localisé au maximum de vraisemblance du QTL : le gène BCMO1, codant pour la β,β -carotène monooxygénase 1, qui clive le β -carotène (de couleur orange) en rétinol (incolore). Le niveau d'expression de BCMO1 dans le muscle P. major (filet) de la lignée HG s'est révélé être supérieur à celui de la lignée LG. Il a donc été décidé d'évaluer l'expression du gène BCMO1 dans le muscle P. major des individus du croisement F2 afin de confirmer le lien entre niveau d'expression du gène et indicateurs de couleur (Le Bihan-Duval et al., 2011). Il a été ainsi montré qu'une augmentation de l'expression en ARNm du gène BCMO1 était associée à une diminution de la coloration rouge et jaune du muscle P. major. Un eQTL contrôlant le niveau d'expression du gène a par ailleurs été identifié sur le chromosome 11 à la « même » position que celui détecté pour la mesure du jaune. Le séquençage de la région promotrice du gène BCMO1 a permis de mettre en évidence une double-mutation (2 SNP) dont la causalité a été prouvée par une expérience de gène rapporteur menée *in vitro*. Enfin, un test moléculaire, mettant en œuvre la technique de HRM (High-Resolution Melting), a été développé pour déterminer rapidement le génotype des animaux à la mutation identifiée. Les différentes étapes qui ont conduit à la découverte de la mutation sont décrites Figure 26.

Au-delà de l'intérêt de cette découverte pour la sélection des volailles sur le caractère « couleur de la viande », un certain nombre de questions subsiste concernant le mode d'action de la mutation et sa régulation par les facteurs alimentaires, en particulier l'apport en caroténoïdes :

- Comment un polymorphisme qui régule l'expression du gène BCMO1 affecte deux pigments xanthophylles qui ne sont pas les substrats de l'enzyme ?

A



B

CTCTGCAATCACATGCTTTATATTGAAATAATTCTTTTCTAGAGGATTTTAAAATTAAC
AACATTGAACTCAGTTAAGTACCTTATCTTGAAAGAAATGCATGAAGTTAAAAATCCCCC
TTCTTCTTAATTATTCCTG/ACCATACTTTTCGCAGAGGCTTCGAGTTGCTGATAACCAGG/ATG
GAATCAGATCACACGTG/AGGAGAATGTAGAATAGTGCCTG/CTTTGTAAAAAGGTGTTTAATT
CAAAGGTGTGCTGCTCAGTTCACTCTGGAAGTCTTGTACCTAAAGAAAAAAGCTCAT
CATTGTTTCAGTGGTGATATATTGTGAGTTAATAGAATAGCCCAGGTTAAATTTGACTGAT
GACACTCCATCTGTCTATAACT/ACCCAAGAAGACAATTCAGAATGGTGGGTAGAGCTTTCT
CCTGTTTTTCTCCCTGCTCCTGCCAAGTGGGG/ACAGGCACCCCTACCAACAGCTCCGACTT
TCCCTGCAATGCTGAAGGTGATATTTTCAGTTTCATTTTGCCTTTGGTGTGCCTGGCTGCC
TGAAGTAGCTTCACACAGAGCAAAGAGGTGAGCTATACTTTTCTTACTCTAACATCAAAT
TAGTGAAAGAGTTAAAGGGACGTGCGAGAAGTACTGTGTATGTGTTAGGGATTAAAGATC
AACTGTTATAAGTTGTGATCTATAAGCCAGCAGCCACTAGCTCAAGTTGCACTTTAACC
TCATCCTTCTATGTAACAGGAAAGAGCTGTTCTTAGCCCAGAGAGGGGG/CACCGCTACG
CCTGCAGGAGCAGCTGGGTAGAGGACACAGGAGAGCGATGGAGACAATATTTAACAGAAA
CAAAGAAGAGCATCCAGA

Figure 27. (A) Courbes de fusion correspondant aux différents génotypes (homozygotes GG ou AA, hétérozygotes AG). (B) Localisation des deux SNP fonctionnels dans le promoteur du gène BCMO1 de poulet (d'après Le Bihan-Duval et al., 2011).

(B) Les deux SNP fonctionnels sont mentionnés en gras et rouge ; Ils sont complètement liés, séparés de 57 nucléotides et consistent en la substitution de deux adénines (A) par deux guanines (G).

- Comment la mutation affecte le métabolisme des caroténoïdes dans d'autres tissus que le muscle ?
- L'activité du gène BCMO1 a-t-elle des conséquences sur l'activité d'autres gènes impliqués dans le transport ou le métabolisme des caroténoïdes ?
- Quels sont les effets de la mutation en présence de β -carotène, substrat préférentiel de BCMO1 ?

Notre premier objectif a été de décrire précisément les conséquences de la mutation sur le métabolisme des caroténoïdes en lien avec les variations de coloration tissulaire. En raison de l'implication des caroténoïdes dans le métabolisme des lipides et des vitamines A et E, les conséquences sur leurs métabolites mais aussi la croissance et l'adiposité de la carcasse ont été caractérisées. Dans un second temps, la régulation des effets de la mutation par le β -carotène (substrat préférentiel de BCMO1) a été étudiée. Les effets de la mutation en interaction ou non avec la nutrition ont pu être étudiés de façon très spécifique grâce au développement du test génétique HRM qui a permis de produire des individus issus d'une population unique et différant uniquement sur leur génotype au locus BCMO1 (Le Bihan-Duval., 2010).

II.3. Production des variants génétiques

La mise en place de nos dispositifs expérimentaux reposait sur la possibilité de produire des individus homozygotes ou hétérozygotes à la mutation identifiée dans le promoteur du gène BCMO1 à partir de parents hétérozygotes issus de la même population d'origine. Ceci a été possible grâce au test HRM (High-Resolution-Melting) mis au point au Laboratoire de Génétique Cellulaire de l'INRA de Toulouse, partenaire du projet.

Le principe de ce test est d'amplifier par qPCR le fragment contenant la mutation à tester et d'hybrider un oligonucléotide en tant que sonde allèle-spécifique qui selon son degré d'appariement avec le fragment amplifié modifie la courbe de fusion et la température à laquelle le pic de fluorescence apparaît (Figure 27A). Dans le cas de nos études, nous avons seulement amplifié le fragment contenant la mutation situé 621 nucléotides en amont du codon ATG puisque les deux SNP fonctionnels identifiés sont complètement liés (Figure 27B). Pour ce SNP le pic de fluorescence est à 63°C pour les individus homozygotes A/A

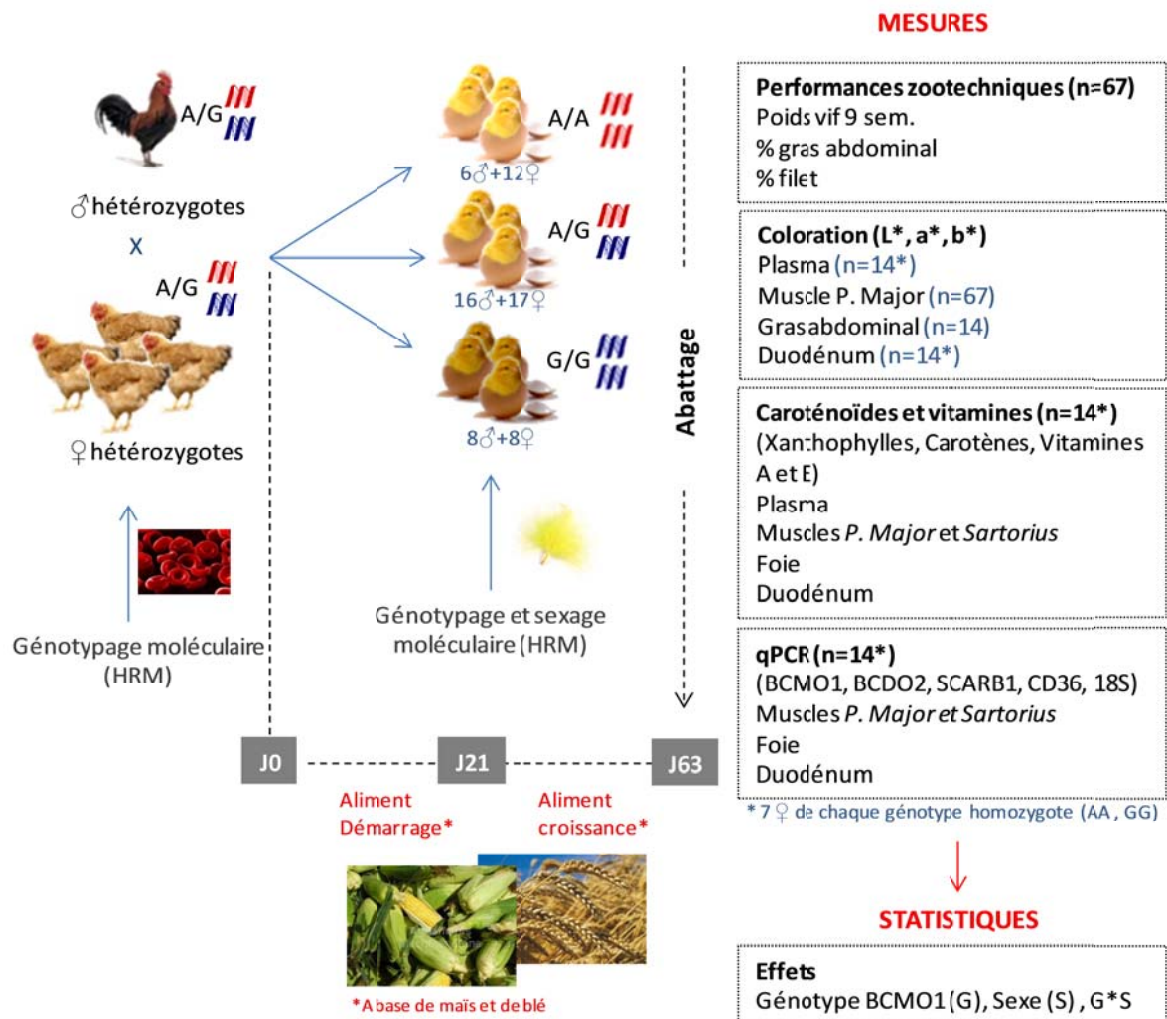


Figure 28. Dispositif expérimental correspondant au manuscrit ‘A mutation in the promoter of the chicken BCMO1 gene alters xanthophylls metabolism through a selective effect on its mRNA levels in the breast muscle.’

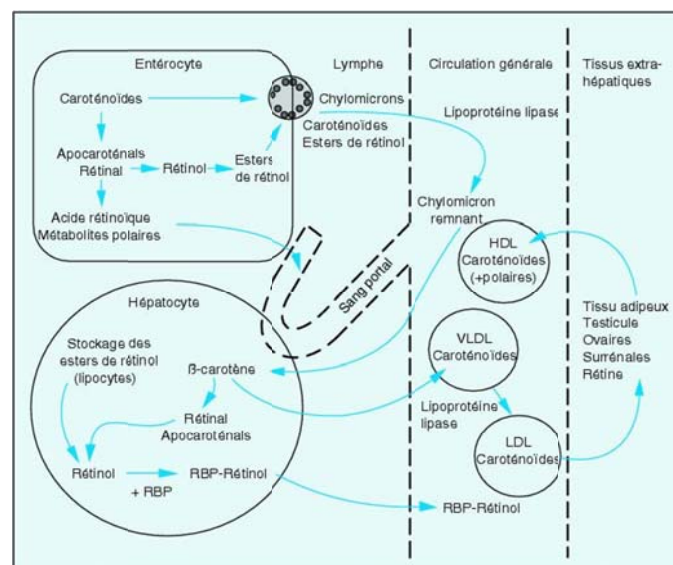


Figure 29. Absorption et transport des caroténoïdes (d’après Borel et al., 2005).

(mésappariement avec la sonde), à 68 °C pour les individus homozygotes G/G (appariement parfait avec la sonde) et à 63 °C et 68°C pour les hétérozygotes A/G.

Les animaux utilisés dans nos expériences étaient tous issus de la lignée expérimentale HG qui contrairement à la lignée LG comprend des individus porteurs de l'un ou l'autre des allèles (A ou G). Ceci a permis de sélectionner des reproducteurs hétérozygotes à la mutation (AG) pour produire des descendants de différents génotypes (AA, GG ou AG).

II.4. Plans expérimentaux

Le premier dispositif expérimental mis en place est décrit Figure 28. Suite au croisement de reproducteurs hétérozygotes (A/G), 67 poussins (génotypés et sexés par PCR) ont été élevés dans des conditions standards jusqu'à leur âge d'abattage de 9 semaines. Dans cette expérience, les animaux ont reçu un aliment conventionnel à base de blé et de maïs. Ce schéma expérimental permettait d'évaluer les effets du génotype à la mutation dans un même fond génétique et de tester les éventuelles interactions avec le sexe des animaux. Les différentes analyses effectuées ont permis de caractériser les performances de croissance et de composition corporelle des animaux, leur statut en caroténoïdes et en vitamines A et E ainsi que la coloration de certains tissus. Ces mesures ont pu être mises en relation avec les variations d'expression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des caroténoïdes (SCARB1, CD36, BCDO2, BCMO1) qui ont été quantifiés dans différents compartiments participant à l'absorption (le duodénum) et l'accumulation (foie et muscles squelettiques) de ces micronutriments (Figure 29).

Le deuxième dispositif expérimental mis en place est décrit Figure 30. Dans ce cas des reproducteurs hétérozygotes (A/G) mais aussi quelques homozygotes (A/A ou G/G) ont été croisés pour obtenir 533 poussins qui ont été sexés et génotypés par PCR dans les 15 jours qui ont suivi leur éclosion. De 0 à 21 jours, les animaux homozygotes (A/A ou G/G) ont été élevés ensemble et ont reçu un régime démarrage à base de blé, c'est-à-dire limitant l'apport en pigments xanthophylles. De 21 à 63 jours (âge d'abattage), les animaux des deux génotypes ont été répartis équitablement en deux lots : un premier lot recevant un régime croissance à base de blé et un deuxième lot recevant le même régime supplémenté avec 10 mg/kg de β -carotène. Ce schéma expérimental permettait d'évaluer les effets du génotype à la

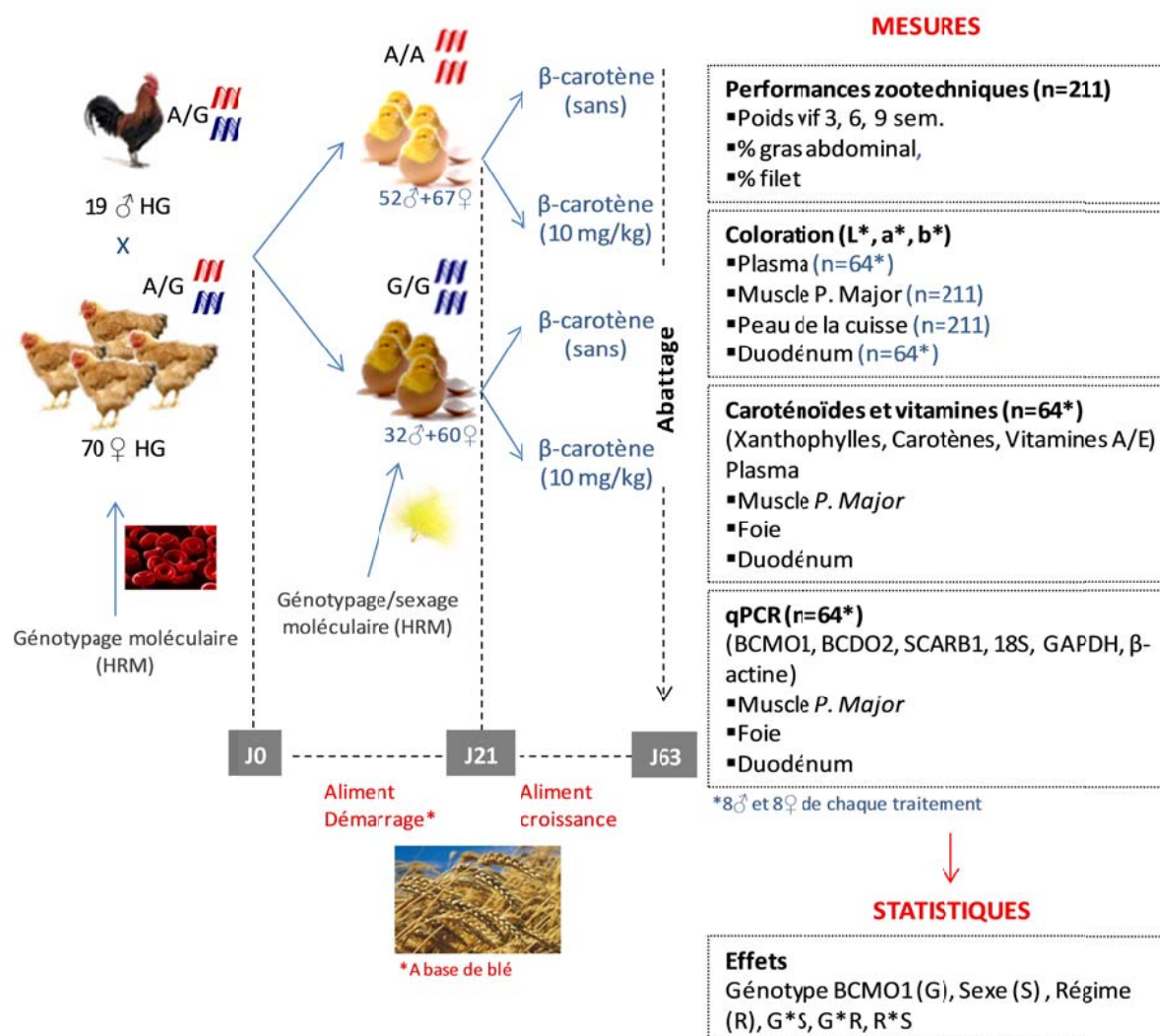


Figure 30. Dispositif expérimental correspondant au manuscrit ‘Nutrigenetics of carotenoid metabolism in the chicken: a polymorphism at the BCMO1 locus alters the response to dietary β -carotène.’

mutation dans un même fond génétique, de l'apport en β -carotène, du sexe et de tester les éventuelles interactions entre ces différents facteurs de variation. Comme dans l'expérience précédente, les différentes analyses effectuées ont permis de caractériser les performances de croissance et de composition corporelle des animaux, leur statut en caroténoïdes et en vitamines A et E ainsi que la coloration de certains tissus. Ces mesures ont été mises en relation avec les variations d'expression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des caroténoïdes (SCARB1, CD36, BCDO2, BCMO1) qui ont été quantifiés dans différents compartiments participant à l'absorption (le duodénum) et l'accumulation (foie et muscle) de ces micronutriments (Figure 29).

Les procédures mises en place et les principaux résultats de ces études font l'objet de deux manuscrits :

- "A mutation in the promoter of the chicken BCMO1 gene alters xanthophyll metabolism through a selective effect on its mRNA levels in the breast muscle" soumis à '*Journal of Animal Science*' et,
- 'Nutrigenetics of carotenoid metabolism in the chicken: a polymorphism at the BCMO1 locus alters the response to dietary β -carotene' à soumettre à '*Journal of Nutrition*'

Certains éléments complémentaires ainsi que les résultats et les perspectives à ces travaux seront discutés à l'issue de la présentation de chaque manuscrit.

II. 5. Principaux résultats de l'étude (article 2)



**A mutation in the promoter of the chicken BCMO1 gene
alters xanthophyll metabolism through a selective effect on
its mRNA levels in the breast muscle**

Journal:	<i>Journal of Animal Science</i>
Manuscript ID:	E-2012-5240.R1
Manuscript Type:	Animal Growth, Physiology, and Reproduction
Date Submitted by the Author:	23-Apr-2012
Complete List of Authors:	Jlali, Maamer; Institut National de la Recherche Agronomique, Unité de Recherches Avicoles Graulet, Benoît; Institut National de la Recherche Agronomique, Unité de Recherches sur les Herbivores Chauveau, Béatrice; Institut National de la Recherche Agronomique, Unité de Recherches sur les Herbivores Chabault, Marie; Institut National de la Recherche Agronomique, Unité de Recherches Avicoles Godet, Estelle; Institut National de la Recherche Agronomique, Unité de Recherches Avicoles Leroux, Sophie; Institut National de la Recherche Agronomique, Laboratoire de Génétique Cellulaire Praud, Christophe; Institut National de la Recherche Agronomique, Unité de Recherches Avicoles Le Bihan-Duval, Elisabeth; Institut National de la Recherche Agronomique, Unité de Recherches Avicoles Duclos, Michel; Institut National de la Recherche Agronomique, Unité de Recherches Avicoles Berri, Cecile; Institut National de la Recherche Agronomique, Unité de Recherches Avicoles
Key Words:	β , β -carotene 15,15'-monooxygenase 1 , polymorphism, carotenoid, chicken, yellow meat color

SCHOLARONE™
Manuscripts

1 **Running head: BCMO1 and xanthophyll metabolism**

2

3 **A mutation in the promoter of the chicken *β,β-carotene 15,15'-monooxygenase 1* gene**
4 **alters xanthophyll metabolism through a selective effect on its mRNA levels in the breast**
5 **muscle¹**

6

7 M. Jlali^{*}, B. Graulet[†], B. Chauveau-Duriot[‡], M. Chabault^{*}, E. Godet^{*}, S. Leroux[‡], C. Praud^{*},
8 E. Le Bihan-Duval^{*}, M. J. Duclos^{*}, and C. Berri^{*2}

9

10 ^{*}INRA, UR83, Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France,

11 [†]INRA, UR1213, Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France, and

12 [‡]INRA, UMR0444, Laboratoire de Génétique Cellulaire, BP52627, F-31326 Cedex, France

13

14 ¹This research was supported by a grant from INRA DGER. Maamer Jlali is a PhD student
15 supported by grant from the Government of Tunisia. The authors would like to thank the staff
16 of the poultry breeding facilities (INRA, UE 1295 Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours,
17 F-37380 Nouzilly, France) and the avian research unit (INRA, UR83 Recherches Avicoles, F-
18 37380 Nouzilly, France) for their valuable technical assistance.

19

20 ²Corresponding author: Cecile.Berri@tours.inra.fr, phone: 332-4742-7688, fax: 332-4742-
21 7778

22

23

ABSTRACT: A polymorphism in the promoter of the β,β -carotene 15,15'-monooxygenase 1 (*BCMO1*) gene recently was identified in an experimental cross between 2 chicken lines divergently selected on growth rate and found to be associated with variations in the yellow color of the breast meat. In this study, the effects of the polymorphism on several aspects of carotenoid metabolism were evaluated in chickens sharing the same genetic background except for their genotype at the *BCMO1* locus. We confirmed that *BCMO1* mRNA levels varied ($P < 0.001$) between the 2 homozygous genotypes (GG << AA) and in the Pectoralis major muscle. By contrast, *BCMO1* mRNA expression was not affected ($P > 0.05$) by the polymorphism in the duodenum, liver, or Sartorius muscle. The breast meat of GG chickens was more ($P < 0.001$) yellow and richer in lutein ($P < 0.01$) and zeaxanthin ($P < 0.05$) compared to that of AA chickens, whereas these parameters did not differ ($P > 0.05$) in the other tissues tested. The GG were also characterized by lower ($P < 0.01$) plasma lutein and zeaxanthin levels than AA without affecting plasma and tissue levels of fat-soluble vitamins A and E. As lutein and zeaxanthin are usually not considered as substrates of the *BCMO1* enzyme, the impact of *BCMO1* polymorphism on the activity of other genes involved in carotenoid transport (*SCARB1* and *CD36* encoding the scavenger receptor class B type I and the cluster determinant 36, respectively) and metabolism (*BCDO2* encoding β,β -carotene 9',10'-dioxygenase 2) was evaluated. The *BCMO1* polymorphism did not affect mRNA levels of *BCDO2*, *SCARB1*, or *CD36*, regardless of tissue considered. Taken together, these results indicated that a genetic variant of *BCMO1* specifically changes lutein and zeaxanthin content in the chicken plasma and breast muscle, without impairing vitamin A and E metabolism.

Key words: β,β -carotene 15,15'-monooxygenase 1, carotenoid, chicken, yellow meat color, polymorphism

INTRODUCTION

Carotenoids represent a wide group of naturally occurring pigments that are synthesized de novo by photosynthesizing plants, algae, and several microorganisms. Because animals do not synthesize carotenoids, they must obtain them from their diet. Among the proteins involved in carotenoid metabolism, β,β -carotene 15,15'-monooxygenase 1 (**BCMO1**) is mainly responsible for the central oxidative cleavage of β -carotene into 2 retinal molecules (von Lintig and Vogt, 2004), and variations in its activity are associated with changes in plasma and tissue β -carotene and vitamin A concentrations (Hessel et al., 2007; Lindqvist et al., 2007; Leung et al., 2009). Two fully linked SNP, positioned within the proximal promoter of the *BCMO1* gene, were recently found to be associated with differential expression of the *BCMO1* gene in the muscle and with variations in breast meat lutein and zeaxanthin content and yellow color in the chicken (Le Bihan-Duval et al., 2010, 2011). The polymorphism in the promoter of the chicken *BCMO1* gene provides a unique model to explain further the role of BCMO1 in controlling carotenoid metabolism and status. Indeed, the genotyping of broiler breeders at the *BCMO1* locus makes it possible to produce individuals with a homogeneous genetic background but differing in their genotype at the *BCMO1* locus.

Based on the comparison of these genetic variants, the aim of the present study was to assess how *BCMO1* gene activity affects carotenoid status from the site of uptake (duodenum) to the sites of transport (plasma) and accumulation (liver and skeletal muscles). Because lutein and zeaxanthin are not considered to be substrates of BCMO1, the regulation of other genes involved in carotenoid cleavage (β,β -carotene 9',10'-dioxygenase 2, **BCDO2**) and uptake (scavenger receptor class B type I (**SR-BI**), encoded by the *SCARB1* gene, and cluster determinant 36 (**CD36**) was also studied. The impact of the polymorphism on fat-soluble

vitamins A and E that share common regulation pathways with carotenoids was also evaluated with its overall impact on chicken growth, tissue yields, and coloration.

MATERIALS AND METHODS

All procedures involving animals were performed in accordance with the European Union Guidelines for animal care and under authorization 37-112 delivered to C. Berri by the French Ministry of Agriculture.

Reagents

Total RNA extraction reagent (RNA Now) was obtained from Ozyme (Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Treatment with DNase was done using Ambion DNA-Free 1906 Kit obtained from Clinisciences (Montrouge, France). Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Superscript II) was purchased from Invitrogen (Illkirch, France) and random primers were obtained from Promega (Charbonnières les Bains, France). Real-time PCR premix (SYBR Green I qPCR Master Mix Plus) was obtained from Eurogentec (Angers, France). All-E- β -carotene, retinol, lutein, α -tocopherol, δ -tocopherol, γ -tocopherol, tocopheryl acetate, retinyl acetate, retinyl myristate, retinyl palmitate, and retinyl stearate were purchased from Sigma (Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Zeaxanthin, β -cryptoxanthin, echinenone, 9Z- β -carotene, and 13Z- β -carotene were purchased from Carotenature (Lupsingen, Switzerland). All solvents used were ultra-pure liquid chromatography grade and were obtained from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Ultrapure water was prepared using a milli-Q system (Millipore, Millford, MA).

99 *Birds and Housing*

100

101 Two fully linked SNP were recently identified within the proximal promoter of the
102 chicken *BCMO1* gene at positions -678 and -621 upstream of the start codon (Le Bihan-Duval
103 et al., 2010, 2011). They correspond to the substitution of 2 adenines (A/A) by 2 guanines
104 (G/G) and define 2 haplotypes (AN₅₇A and GN₅₇G), which have been segregated within a
105 chicken line maintained at INRA (Nouzilly, France). Heterozygous adult breeders (AG) were
106 selected and mated to produce homozygous (AA or GG) and heterozygous offspring. Because
107 the 2 SNP are fully linked, the genotyping only considered the SNP positioned -621 bp
108 upstream of the start codon. The genotype was determined by high-resolution melting (Le
109 Bihan-Duval et al., 2011) from genomic DNA, extracted according to Nadaf et al. (2007)
110 from blood (breeders) or from 2 wing feathers removed at hatching (offspring). Three
111 genotypes were defined: homozygous AA and GG, and heterozygous AG. Chick sex was
112 determined by PCR according to Clinton et al. (2001). A total of 67 chicks differing in
113 genotype at the *BCMO1* locus were studied. The distribution of *BCMO1* genotypes and sex in
114 the experimental population was: 37 females of which 12 were homozygous AA, 8
115 homozygous GG, and 17 heterozygous AG, and 30 males of which 6 were homozygous AA,
116 8 homozygous GG, and 16 heterozygous AG. From hatching to 9 wk, chickens were reared in
117 a conventional poultry house (INRA, UE1295 Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours, F-
118 37380 Nouzilly) in accordance with the European Union Guidelines for animal care and
119 under authorization 37-112 delivered to C. Berri by the French Ministry of Agriculture. They
120 were given ad libitum access to water and feed (Table 1). The levels of lutein and zeaxanthin
121 in the growth diet were 2.1 µg/kg DM and 2.7 µg/kg DM of diet, respectively, and no β-
122 carotene was detected. However, because of the extreme sensitivity of carotene molecules to
123 temperature, oxygen, and light, we could not exclude the possibility that feed contained small

amounts of β -carotenes which may have been degraded between the experiment and chemical analysis.

Sampling and Carcass Processing

At 9 wk of age, all chickens were weighed and slaughtered, and the carcasses were processed as described in Berri et al. (2007). Blood samples were collected in heparin during bleeding and immediately chilled on ice. Blood samples were centrifuged at $3,000 \times g$ at 4°C for 10 min, and serum was aliquoted and stored at -20°C until analyzed. Duodenum mucosa, liver, Pectoralis major (**P. major**), and Sartorius (**SART**) muscles were collected 15 min post-mortem from 7 males and 7 females of each homozygous genotype (AA and GG), then immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. All carcasses were processed 1 d after slaughter. Abdominal fat and breast muscles (Pectoralis minor and Pectoralis major) were removed and weighed, and their respective yields were calculated and expressed as percentages of live BW at slaughter.

Color Measurements

The absorbance spectrum of the plasma was measured between wavelengths 400 nm and 700 nm by spectrophotometry (Tecan, Infinite M200). Each absorbance spectrum was translated to make the value at 530 nm equal to 0 (Nozière et al., 2006; Calderón et al., 2007). The color index (**CI**), which corresponds to the absolute value of the integral of the translated spectrum between 450 nm and 530 nm, was measured by calculating the trapezoid area (**TA**) between 450 nm and 530 nm as follows: $\text{CI}_{450 \text{ to } 530\text{nm}} = \text{TA}_{450 \text{ to } 460} + \text{TA}_{460 \text{ to } 470} + \text{TA}_{470 \text{ to } 480} +$

TA_{480 to 490} + TA_{490 to 500} + TA_{500 to 510} + TA_{510 to 520} + TA_{520 to 530}. The values were only considered when the coefficient of variation between 3 repetitions was < 5%.

The color of P. major muscle (internal part, n = 67), duodenum (external face, n = 14), and abdominal fat (n = 14) was measured using a Miniscan spectrophotometer (Hunterlab, Reston, VA) according to the CIELAB trichromatic system as lightness (L*), redness (a*), and yellowness (b*) values 15 min post-mortem for the duodenum and 24 h post mortem for P. major muscle and abdominal fat.

Isolation of Total RNA and Real-time Quantitative Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) Analysis

Total RNA was extracted from tissues (duodenum, liver, P. major, and SART muscles) of 7 females from each homozygous haplotype (AN₅₇A, GN₅₇G) using a commercial kit (RNA Now) according to the manufacturer's instructions derived from the original method of Chomczynski and Sacchi (1987). Total RNA concentrations were measured by spectrophotometer (OD 260 nm) using a NanoDrop ND-1000 (Labtech, Palaiseau, France) and their integrity was checked by electrophoresis. The cDNA was synthesized from 5 µg of total RNA using random primers and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. Real-time quantitative RT-PCR analyses were performed using the ABI PRISM 7000 System (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France), with the following primers: for BCMO1, sense 5'-AAC AAA GAA GAG CAT CCA GAG CC-3' and antisense 5'-GCC AAG CCA TCA AAC CAG TG-3'; for BCDO2, sense 5'-GGT TTC TTT CTG AGC CTG ACC TTG-3' and antisense 5'-CCA GCT AGG AAT AAT GGA ATA GGA-3'; for SCARBI, sense 5'-ACC TCT TTG AAG TGC AGA ACCC-3' and antisense 5'-ATG ACA ACG ACA CCG TCT CCT-3'; for CD36 sense 5'-TCC TGT CTG CAC CCT GTC AAA-3' and antisense 5'-GGA CGT GCT

CCA AAG TTC AAA A-3'; and for *18S*, sense 5'-CCA GCT AGG AAT AAT GGA ATA GGA-3' and antisense 5'-CCG GCC GTC CCT CTT AAT-3'. Each PCR run included a negative no-template control (H₂O), reference samples (a pool of all cDNA), and unknown samples, measured in one 96-well plate. Expression was quantified in triplicate and *18S* rRNA was used as the endogenous control in the comparative cycle threshold method (Pfaffl, 2001) for each condition.

Quantification of Carotenoids and Fat-soluble Vitamins

All carotenoids and fat-soluble vitamins were extracted from plasma and tissues (duodenum, liver, P. major, and SART muscles) of 7 females from each homozygous haplotype (AN₅₇A, GN₅₇G). Extractions were performed at room temperature under yellow light to minimize light-induced damage, according to a slightly modified version of the technique described by Chauveau-Duriot et al. (2010). Briefly, for plasma an 800-μL aliquot was deproteinized by adding 1 mL of ethanol containing echinenone, retinyl acetate, and tocopherol acetate (as internal standards). The mixture obtained was extracted twice with 2 mL of hexane. The hexane phases obtained after centrifugation (1,000 × g for 5 min at room temperature) were pooled and evaporated to dryness under nitrogen. The dried extract was dissolved in 20 μL of tetrahydrofuran then with 180 μL of acetoni-

trile/dichloromethane/methanol (75:10:15, v/v/v), and transferred into a 150-μL glass insert placed in a 2-mL screw-top glass vial for automatic sampling. Twenty microliters were used for ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) analysis according to Chauveau-Duriot et al. (2010).

For the extraction of carotenoids and fat-soluble vitamins from tissues (duodenum, liver, SART, and P. major muscles), 200 mg to 1 g of tissue were homogenized with 1 mL of

ethanol containing internal standards. The mixture was extracted twice with 4 mL of hexane. The hexane phases obtained were subjected to the same treatments as those for plasma. Five microliters of liver samples or 20 μ L of other tissues were injected for UPLC analysis.

Analytical conditions for UPLC analysis were those recommended by Chauveau-Duriot et al. (2010). In these conditions, the whole vitamin A forms (retinol and retinyl esters) were quantified at 325 nm. The different retinyl esters were identified by retention time and spectral analysis by comparison with pure (> 95%) standards. Retention times were 12.32 (SE = 0.00) min for retinyl acetate, 29.24 (SE = 0.04) min for retinyl myristate, 33.76 (SE = 0.12) min for retinyl palmitate, and 41.52 (SE = 0.20) min for retinyl stearate. Quantification of the compounds was performed using Empower Pro software (Waters Corporation, Milford, MA) and their corresponding concentrations were calculated using an external standard curve. The concentrations obtained were adjusted according to percentage recovery of the added internal standard.

Statistical Analyses

Data were analyzed by SAS 8.1 (SAS Inst. Inc., Cary, NC). The accepted type I error was 5%. The effects of *BCMO1* genotype (AA vs. GG) on mRNA levels, carotenoids, vitamins, and color traits were assessed by 1-way ANOVA. For growth, body composition, and breast meat color parameters, the effects of *BCMO1* genotype (AA, AG, and GG), sex, and their possible interactions were analyzed by a 2-way ANOVA (GLM procedure) with type III sum of squares. The effects of tissue origin (duodenum, liver, P. major, and SART muscles) on mRNA levels were evaluated by 1-way ANOVA. Comparisons of means for each significant effect were performed by Tukey's test using the Least Squares Mean statement of the GLM procedure. Pearson correlation coefficients were analyzed with the

CORR procedure to assess the relationship between *BCMO1* mRNA level, carotenoid content, and color.

RESULTS

Variations in BCMO1 mRNA Levels and Carotenoid Concentrations: Implication for Plasma and Tissue Coloration

All tissues tested expressed *BCMO1*. Its relative expression level was about 3-fold higher ($P < 0.001$) in the P. major muscle of AA than of GG chickens. By contrast, *BCMO1* expression in duodenum, liver, and SART muscle was similar ($P > 0.05$) between AA and GG genotypes (Figure 1A).

Lutein and zeaxanthin were present in plasma, liver, and P. major and SART muscles (Figures 1B and 1C) but were not detected in the duodenum. The AA chickens exhibited higher ($P < 0.01$) circulating levels of lutein and zeaxanthin (+47% and +31%, respectively) than GG chickens. By contrast, the GG chickens exhibited higher lutein (+76%, $P < 0.01$) and zeaxanthin (+41%, $P < 0.05$) levels than AA chickens in the P. major muscle. Lutein and zeaxanthin concentrations were not altered ($P > 0.05$) by genotype in liver and SART muscle.

The genotype at *BCMO1* affected ($P < 0.001$) the color of breast meat, GG chickens exhibiting a more yellow (higher b^*) P. major muscle than AA and AG chickens (Table 2). This result is consistent with the correlations found in P. major muscle between the yellow index (b^*) and the total lutein and zeaxanthin contents ($R = 0.83$; $P < 0.001$) and between the yellow index and the *BCMO1* mRNA level ($R = -0.73$; $P < 0.001$). A strong negative correlation ($R = -0.70$; $P < 0.001$) also was found in breast muscle between the *BCMO1* mRNA level and the total lutein and zeaxanthin contents, which was not found in the other

tissues studied (data not shown). Despite a strong positive correlation ($R = 0.85$; $P < 0.001$) between the plasma color index and its total lutein and zeaxanthin contents, there was no difference ($P > 0.05$) in plasma color between AA and GG chickens (Table 2). The colors of the duodenum and abdominal fat pad were not affected by genotype (data not shown).

Consequences of BCMO1 Polymorphism on Fat-soluble Vitamin Concentrations, Growth, Body Composition, and SCARB1, CD36, and BCDO2 mRNA Levels

The 3 genes (*SCARB1*, *CD36*, and *BCDO2*) were expressed in the duodenum, liver, and P. major and SART muscles, each with its tissue-specific pattern (Table 3). The mRNA levels of *SCARB1* and *BCDO2* were much higher in the duodenum than in the liver and muscles. By contrast, *CD36* mRNA levels were much higher in liver and SART muscle than in the duodenum and P. major muscle. Regardless of the tissue, *BCDO2*, *SCARB1*, and *CD36* mRNA levels were similar between AA and GG genotypes (Table 3).

Retinol (vitamin A) was detected in plasma and in all tissues tested, ranked as follows: liver > plasma > SART $\geq$ duodenum $\geq$ P. major (Table 4). The storage forms of vitamin A (retinyl esters) were detected only in the liver, retinyl palmitate representing about 58%, retinyl stearate 39% and retinyl myristate 3%. The α -tocopherol content (vitamin E) was almost 2-fold greater in the liver than in the plasma and duodenum and 5-fold higher than in P. major and SART muscles (Table 4). The γ -tocopherol level was lower than that of α -tocopherol. The γ -tocopherol content was higher in the liver and plasma than in muscles and it was not detected in the duodenum. Neither of these vitamin A or vitamin E metabolites was affected by genotype (data not shown).

Body weight and carcass yields are presented in Table 5. At 9 wk of age, there was no effect of *BCMO1* genotype on BW, breast meat yield, or abdominal fatness ($P > 0.05$, Table

5). By contrast, gender affected BW and yields, females being lighter ($P < 0.001$), fatter ($P < 0.05$), and exhibiting greater ($P < 0.001$) breast meat yield than males. There was no interaction between gender and genotype effects on body or carcass traits ($P > 0.05$).

DISCUSSION

Our first results linking *BCMO1* gene activity and meat color were obtained in chickens originating from a F2 cross between 2 experimental lines divergently selected for high (HG) or low (LG) growth rate (Le Bihan-Duval et al., 2011). The large variability observed in this F2 population for a number of production traits allowed for the identification of several QTL in relation to metabolic traits, growth, body composition, and meat quality (Nadaf et al., 2007, 2009). The present study was designed to study the specific effect of the *BCMO1* mutation, without interference with loci controlling the other traits. For this purpose, broiler breeders were selected within the HG line for their status at the *BCMO1* locus to produce offspring with similar growth performances and sharing a common genetic background.

The present study included several tissues while the previous one focused on a single tissue, the P. major muscle. The liver and duodenum were chosen because of their central role in carotenoid uptake and storage. The SART muscle was chosen because of its distinctive contractile and metabolic properties. It is a mixed muscle containing slow- and fast-twitch fibers with an oxydo-glycolytic metabolic profile, while the P. major muscle is a pure fast-twitch glycolytic muscle (Rémignon et al, 1994). The comparison of homozygous AA and GG chickens indicated that the effects of the mutation were restricted to the P. major muscle (GG << AA), although the activity of the gene was the least in this tissue. Indeed, the mutation did not affect the activity of the gene in the SART muscle, duodenum, or liver. This

tissue-specific response suggests that one or several tissue-specific transcription factor binding sites could be affected by the mutations in the *BCMO1* promoter in the chicken.

The 2 linked SNP are actually proximal to a putative vitamin D receptor (**VDR**) response element (Le Bihan-Duval et al., 2011), but further evidence suggesting the involvement of this VDR in relaying the effects of the mutation on *BCMO1* gene activity remains to be demonstrated. A number of previous reports (Bachmann et al., 2002; Chichili et al., 2005; Takitani et al., 2006) suggest that the activity of the BCMO1 enzyme is regulated at the transcription level; it was, therefore, assumed that the differences in *BCMO1* mRNA levels observed should lead to a decrease in activity of the BCMO1 enzyme in GG chickens.

As in the previous experiment (Le Bihan-Duval et al., 2011), higher *BCMO1* mRNA levels in the P. major muscle in AA were associated with lower levels of lutein and zeaxanthin in this tissue, and probably explained the color differences. By contrast, in other tissues (SART muscle, duodenum, or liver) where no variations in *BCMO1* mRNA levels were observed, lutein and zeaxanthin contents were unchanged, and in the duodenum yellow color was not affected by genotype. All these findings strengthened the hypothesis that the mutation was the actual cause of the meat color phenotypes. Chickens carrying the AA allele also exhibited higher plasma levels of lutein and zeaxanthin than GG, suggesting that change in *BCMO1* gene activity in a single tissue (representing about 12% of BW) might impact plasma carotenoid levels. Given that these 2 carotenoids, which lack a non-substituted β -ionone ring, are not measurable substrates of the BCMO1 enzyme, it remains to be determined how a differential activity of this gene could impact on their tissue concentrations (Lindqvist and Andersson, 2002; Kim and Oh, 2009).

One hypothesis might be that the activity of other enzymes or transporters involved in carotenoid metabolism could be changed. The BCDO2 can convert lutein and zeaxanthin into apocarotenoids (Lobo et al., 2012; Mein et al., 2011). The scavenger receptors CD36 and SR-

BI (encoded by the *SCARB1* gene) are involved in β -carotene (During et al., 2005; van Bennekum et al., 2005), as well as in lutein (Reboul et al., 2005; Moussa et al., 2011), uptake by various tissues. Therefore, the expression of these 3 candidate genes was measured. Their mRNA levels varied greatly between tissues but not between the 2 genotypes, which did not support their involvement in explaining differences in lutein and zeaxanthin accumulation between AA and GG chickens.

Although the role of *BCMO1* has mainly been described in connection with β -carotene and vitamin A metabolism (Hessel et al., 2007; Lindqvist et al., 2007; Leung et al., 2009), several human genetic variants near or in the *BCMO1* gene have recently been reported to be associated with variations in circulating or tissue levels of carotenoids other than β -carotene, including zeaxanthin and lutein (Ferrucci et al., 2009; Borel et al., 2011). In the study by Ferrucci et al. (2009), a decrease in blood lycopene, zeaxanthin, and lutein corresponded to increases in β -carotene and α -carotene levels, probably because carotenoids antagonize the absorption, transport, and bioavailability of each other. Even though β -carotene was not at a detectable level in the plasma or the tissues, differences in *BCMO1* activity between AA and GG chickens might affect its concentration, which may impact on zeaxanthin and lutein metabolism. The strong negative correlation observed between *BCMO1* mRNA levels and total amounts of lutein and zeaxanthin in breast muscle supports this hypothesis. Available β -carotene, if converted into vitamin A through the activity of the *BCMO1* enzyme, may not contribute to levels of plasma or tissue retinoids however, which mainly originate from dietary vitamin A. Indeed, our results show that the levels of the different vitamin A forms (retinol or its retinyl ester storage forms in the liver) are not affected by genotype, although as expected they differ among tissues. Loss of *BCMO1* function following gene knock-out abolished vitamin A production from β -carotene in mice (Hessel et al., 2007). It also changed lipid metabolism and susceptibility to diet-induced

obesity, even on a vitamin A-sufficient diet (Hessel et al., 2007). In the study reported here, neither chicken growth rate nor carcass adiposity was affected by genotype. Because carotenoids and vitamin E share common transporters, a possible impact of the *BCMO1* mutation on vitamin E metabolism was examined. No significant effect of genotype on vitamin E levels in plasma or tissues occurred, which was consistent with the absence of a differential expression of the *SCARB1* gene that encodes SR-BI and is involved in vitamin E uptake and bioavailability (Reboul et al., 2006; Rigotti, 2007).

Taken together, our findings show that a mutation in the *BCMO1* promoter, which affects the activity of the gene in vitro (Le Bihan-Duval et al, 2011), leads to tissue-specific differences in vivo. The levels of *BCMO1* mRNA and the storage of the non-provitamin A carotenoids, lutein and zeaxanthin, were only changed in the P. major muscle (AA >> GG for *BCMO1* mRNA and AA < GG for carotenoids, respectively). Plasma levels of lutein and zeaxanthin were affected in the opposite direction (AA > GG). The yellow color of P. major muscle and plasma was positively correlated with lutein and zeaxanthin levels. The mutation did not affect vitamin A or E status, although these vitamins share common regulation pathways with carotenoids. In the conditions of the experiment, where vitamin A was mainly supplied by the diet, the mutation did not affect growth or body composition of the chickens or the expression of various genes involved in uptake (SR-BI and CD36) and metabolism (BCDO2) of carotenoids. These results together indicated that a genetic variant of the *BCMO1* gene can affect pigment content and yellow color of breast muscle in the chicken without impairing overall metabolism and growth.

LITERATURE CITED

- 371 Bachmann, H., A. Desbarats, P. Pattison, M. Sedgewick, G. Riss, A. Wyss, N. Cardinault, C.
372 Duszka, R. Goralczyk, and P. Grolier. 2002. Feedback regulation of beta, beta-carotene
373 15, 15'-monooxygenase by retinoic acid in rats and chickens. *J. Nutr.* 132:3616-3622.
- 374 Berri, C., E. Le Bihan-Duval, M. Debut, V. Santé-Lhoutellier, E. Baéza, V. Gigaud, Y. Jégo,
375 and M. J. Duclos. 2007. Consequence of muscle hypertrophy on Pectoralis major
376 characteristics and breast meat quality of broiler chickens. *J. Anim. Sci.* 85:2005-2011.
- 377 Borel, P., F. S. De Edelenyi, S. Vincent-Baudry, C. Malezet-Desmoulin, A. Margotat, B.
378 Lyan, J. M. Gorrand, N. Meunier, S. Drouault-Holowacz, and S. Bieuvelet. 2011.
379 Genetic variants in BCMO1 and CD36 are associated with plasma lutein concentrations
380 and macular pigment optical density in humans. *Ann. Med.* 43:47-59.
- 381 Calderón, F., B. Chauveau-Duriot, P. Pradel, B. Martin, B. Graulet, M. Doreau, and P.
382 Nozière. 2007. Variations in carotenoids, vitamins A and E, and color in cow's plasma
383 and milk following a shift from hay diet to diets containing increasing levels of
384 carotenoids and vitamin E. *J. Dairy Sci.* 90:5651-5664.
- 385 Chauveau-Duriot, B., M. Doreau, P. Nozière, and B. Graulet. 2010. Simultaneous
386 quantification of carotenoids, retinol, and tocopherols in forages, bovine plasma, and
387 milk: validation of a novel UPLC method. *Anal. Bioanal. Chem.* 397:777-790.
- 388 Chichili, G. R., D. Nohr, M. Schäffer, J. von Lintig, and H. K. Biesalski. 2005. β -Carotene
389 conversion into vitamin A in human retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol*
390 *Vis. Sci.* 46:3562-3569.
- 391 Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid
392 guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- 393 Clinton, M., L. Haines, B. Belloir, and D. McBride. 2001. Sexing chick embryos: a rapid and
394 simple protocol. *Br. Poult. Sci.* 42:134-138.

395 During, A., H. D. Dawson, and E. H. Harrison. 2005. Carotenoid transport is decreased and
396 expression of the lipid transporters SR-BI, NPC1L1, and ABCA1 is downregulated in
397 Caco-2 cells treated with ezetimibe. *J. Nutr.* 135:2305-2312.

398 Ferrucci, L., J. R. B. Perry, A. Matteini, M. Perola, T. Tanaka, and K. Silander. 2009.
399 Common variation in the β -carotene 15,15'-monooxygenase 1 gene affects circulating
400 levels of carotenoids: A genome-wide association study. *Am. J. Human Genet.* 84:123-
401 133.

402 Hessel, S., A. Eichinger, A. Isken, J. Amengual, S. Hunzelmann, U. Hoeller, V. Elste, W.
403 Hunziker, R. Goralczyk, V. Oberhauser, J. von Lintig, and A. Wyss. 2007. CMO1
404 deficiency abolishes vitamin A production from beta-carotene and alters lipid metabo-
405 lism in mice. *J. Biol. Chem.* 282 (46):33553-33561.

406 Kim, Y. -S., and D. -K. Oh. 2009. Substrate specificity of a recombinant chicken β -carotene
407 15,15'-monooxygenase that converts β -carotene into retinal. *Biotechnol. Lett.* 31:403-
408 408.

409 Le Bihan-Duval, E., J. Nadaf, C. Berri, M. J. Duclos, and F. Pitel. 2010. Marqueurs
410 génétiques pour la coloration de la viande. License deposit 2008/08/25; n°
411 EP2161345A1.

412 Le Bihan-Duval, E., J. Nadaf, C. Berri, F. Pitel, B. Graulet, E. Godet, S. Y. Leroux, O.
413 Demeure, S. Lagarrigue, C. Duby, L. A. Cogburn, C. M. Beaumont, and M. J. Duclos.
414 2011. Detection of a Cis eQTL controlling BCMO1 gene expression leads to the
415 identification of a QTG for chicken breast meat color. *Plos One.* 6(7):e14825.
416 doi:10.1371/journal.pone.0014825.

417 Leung, W. C., S. Hessel, C. Méplan, J. Flint, V. Oberhauser, F. Tourniaire, J. E. Hesketh, J.
418 von Lintig, and G. Lietz. 2009. Two common single nucleotide polymorphism in the

- 419 gene encoding β -carotene 15,15'-monooxygenase alter β -carotene metabolism in female
420 volunteers. *FASEB J.* 23:1041-1053.
- 421 Lindqvist, A., and S. Andersson. 2002. Biochemical properties of purified recombinant
422 human beta-carotene 15,15'-monooxygenase. *J. Biol. Chem.* 277:23942-23948.
- 423 Lindqvist, A., J. Sharvill, D. E. Sharvill, and S. Andersson. 2007. Loss-of-function mutation
424 in carotenoid 15,15'-monooxygenase identified in a patient with hypercarotenemia and
425 hypovitaminosis A. *J. Nutr.* 137:2346-2350.
- 426 Lobo, G. P., J. Amengual, G. Placzewski, D. Babino, and J. von Lintig. 2012. Mammalian
427 carotenoid-oxygenases: Key players for carotenoid function and homeostasis. *Biochim.*
428 *Biophys. Acta.* 1821:78-87.
- 429 Mein, J. R., G. G. Dolnikowski, H. Ernst, R. M. Russell, and X. -D. Wang. 2011. Enzymatic
430 formation of apo-carotenoids from the xanthophyll carotenoids lutein, zeaxanthin and β -
431 cryptoxanthin by ferret carotene-9',10'-monooxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.*
432 506:109-121.
- 433 Moussa, M., E. Gouranton, B. Gleize, C. E. Yazidi, I. Niot, P. Besnard, P. Borel, and J.- F.
434 Landrier. 2011. CD36 is involved in lycopene and lutein uptake by adipocytes and
435 adipose tissue cultures. *Mol. Nutr. Food Res.* 55:578-584.
- 436 Nadaf, J., H. Gilbert, F. Pitel, C. Berri, K. Feve, C. Beaumont, M. J. Duclos, A. Vignal, T. E.
437 Porter, J. Simon, S. E. Aggrey, L. A. Cogburn, and E. Le Bihan-Duval. 2007. Identifica-
438 tion of QTL controlling meat quality traits in an F2 cross between two chicken lines
439 selected for either low or high growth rate. *BMC Genomics.* 8:155.
- 440 Nadaf, J., F. Pitel, H. Gilbert, M. J. Duclos, F. Vignoles, C. Beaumont, A. Vignal, T. E.
441 Porter, L. A. Cogburn, S. E. Aggrey, J. Simon, and E. Le Bihan-Duval. 2009. QTL for
442 several metabolic traits map to loci controlling growth and body composition in an F2
443 intercross between high- and low-growth chicken lines. *Physiol. Genomics.* 38:241-249.

444 Nozière, P., P. Grolier, D. Durand, A. Ferlay, P. Pradel, and B. Martin. 2006. Variations in
445 carotenoids, fat-soluble micronutrients, and color in cows' plasma and milk following
446 changes in forage and feeding level. *J. Dairy Sci.* 89:2634-2648.

447 Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-
448 PCR. *Nucleic Acids Res.* 29 (9):e45.

449 Reboul, E, L. Abou, C. Mikail, O. Ghiringhelli, M. André, H. Portugal, D. Jourdheuil-
450 Rahmani, M. J. Amiot, D. Lairon, and P. Borel. 2005. Lutein transport by Caco-2 TC-7
451 cells occurs partly by a facilitated process involving the scavenger receptor class B type
452 I (SR-BI). *Biochem. J.* 387:455-461.

453 Reboul, E., A. Klein, F. Bietrix, B. Gleize, C. Malezet-Desmoulins, M. Schneider, A.
454 Margotat, L. Lagrost, X. Collet, and P. Borel. 2006. Scavenger receptor class B type I
455 (SR-BI) is involved in vitamin E transport across the enterocyte. *J. Biol. Chem.*
456 281:4739-4745.

457 Rémignon, H., L. Lefaucheur, J. C. Blum, and F. H. Ricard. 1994. Effects of divergent
458 selection for body weight on three skeletal muscles characteristics in the chicken. *Br.*
459 *Poult. Sci.* 35:65-76.

460 Rigotti, A. 2007. Absorption, transport, and tissue delivery of vitamin E. *Mol. Aspects Med.*
461 28:423-436.

462 Takitani, K., C. L. Zhu, A. Inoue, and H. Tamai. 2006. Molecular cloning of the rat β -
463 carotene 15,15'-monooxygenase gene and its regulation by retinoic acid. *Eur. J. Nutr.*
464 45:320-326.

465 van Bennekum, A., M. Werder, S. T. Thuahnai, C. H. Han, P. Duong, D. L. Williams, P.
466 Wettstein, G. Schulthess, M. C. Phillips, and H. Hauser. 2005. Class B scavenger
467 receptor-mediated intestinal absorption of dietary β -carotene and cholesterol. *Biochem.*
468 44:4517-4525.

469 von Lintig, J., and K. Vogt. 2004. Vitamin A formation in animals: Molecular identification
470 and functional characterization of carotene cleaving enzymes. J. Nutr. 134:251S-256S.
471

For Peer Review

Figure 1. (A) Relative mRNA levels of β,β -carotene 15,15'-monooxygenase 1 (*BCMO1*),
(B) concentrations of lutein, and **(C)** zeaxanthin in different tissues (and plasma for
carotenoids) from chickens differing in their genotype at the *BCMO1* locus (AA vs. GG).
Relative expression of the *BCMO1* gene (i.e., corrected for *18S ribosomal RNA*) was
determined by real-time reverse transcription PCR. Lutein and zeaxanthin concentrations are
expressed in $\mu\text{g/mL}$ in plasma and $\mu\text{g/g}$ of fresh tissue. Data are expressed as means $\pm$ SE (n =
7). * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, difference between lines.

Table 1. Ingredients and characteristics of starter (0 to 3 weeks) and growth (3 and 9 weeks) diets fed to chickens

Item	Diets	
	Starter	Growth
Ingredients, g/kg		
Maize	275.5	404.6
Wheat	204.1	203.6
Soybean meal, 48%	312.2	288.0
Rapeseed oil	50.0	50.0
Corn gluten	17.9	17.5
Pea	100.0	-
Dicalcium phosphate	18.5	16.7
CaCO ₃	11.9	7.9
NaCl	4.0	4.0
L-Lys HCl	0.1	1.7
DL-Met	1.3	1.5
Anticoccidial	0.5	0.5
Premix ¹	4.0	4.0
Calculated content		
ME, MJ/kg	12.51	12.96
CP, g/kg	217.5	200
Lysine, g/kg	11.6	11.3
Methionine, g/kg	4.6	4.6
TSAA, g/kg	8.2	8.2
Threonine, g/kg	8.1	7.4
Tryptophan, g/kg	2.5	2.3
Calcium, g/kg	12.3	9.0
Available P, g/kg	4.3	3.8

¹Supplied per kilogram of diet: 15,000 IU retinyl acetate; 4,300 UI cholecalciferol; 100 mg

DL- α tocopherol acetate; 5 mg menadione; 5 mg thiamine; 8 mg riboflavin; 7 mg pyridoxine;

0.02 mg cyanocobalamin; 100 mg niacin; 3 mg folic acid; 0.3 mg biotin; 25 mg calcium

pantothenate; 550 mg choline; 80.83 mg manganese oxide; 90.1 mg zinc sulfate; 58.2 mg

ferric sulfate; 20.02 mg copper sulfate; 2 mg calcium iodine; 0.2 mg sodium selenium; 0.6 mg

cobalt carbonate; and 50 mg anti-oxidant.

Table 2. Plasma and breast meat color parameters of chickens according to β,β -carotene
15,15'-monooxygenase 1 genotype¹

Item	Genotype			SEM	P-value
	AA	AG	GG		
Plasma color index	35.14	Nd ²	29.64	2.62	NS ³
Breast meat color					
Lightness, L*	46.83	47.55	48.21	0.61	NS
Redness, a*	-1.26	-1.40	-1.41	0.17	NS
Yellowness, b*	8.69 ^b	8.97 ^b	10.14 ^a	0.27	< 0.001

^{a,b}Least squares means within a row without a common superscript differ ($P \leq 0.05$).

¹Data are least squares means of 7 AA and 7 GG for plasma color index, and of 18 AA, 33 AG, and 16 GG for breast color parameters.

²Nd = not determined.

³NS = not significant.

Table 3. Relative mRNA levels of genes involved in carotenoid transport and metabolism in several tissues of chickens according to β,β -carotene 15,15'-monooxygenase 1 genotype¹.

Tissue	Gene ²	Genotype		SEM	P-value
		AA	GG		
Duodenum	<i>SCARB1</i>	0.81	0.68	0.20	NS ³
	<i>CD36</i>	0.22	0.25	0.09	NS
	<i>BCDO2</i>	0.07	0.06	0.01	NS
Liver	<i>SCARB1</i>	0.06	0.05	0.005	NS
	<i>CD36</i>	1.20	0.98	0.10	NS
	<i>BCDO2</i>	0.021	0.017	0.002	NS
Pectoralis major muscle	<i>SCARB1</i>	0.018	0.015	0.002	NS
	<i>CD36</i>	0.20	0.17	0.04	NS
	<i>BCDO2</i>	0.005	0.006	0.001	NS
Sartorius muscle	<i>SCARB1</i>	0.03	0.03	0.004	NS
	<i>CD36</i>	0.87	0.97	0.13	NS
	<i>BCDO2</i>	0.01	0.01	0.002	NS

¹Data are least squares means of 7 AA and 7 GG chickens. The mRNA of each gene was corrected for *18S ribosomal RNA*.

²*SCARB1* = scavenger receptor class B type 1; *CD36* = cluster determinant 36; and *BCDO2* = β,β -carotene 9',10'-dioxygenase 2.

³NS = not significant.

507 **Table 4.** Fat-soluble vitamin concentrations in chickens according to tissue or plasma¹

Item	Plasma	Duodenum	Liver	Muscle		SEM	<i>P</i> -value
				Pectoralis major	Sartorius		
Vitamin A							
Retinol	1.17 ^b	0.26 ^{cd}	1.91 ^a	0.14 ^d	0.39 ^c	0.05	< 0.001
Myristate	ND	ND	13.46	ND	ND	0.74	< 0.001
Palmitate	ND	ND	246.80	ND	ND	9.30	< 0.001
Stearate	ND	ND	165.21	ND	ND	5.93	< 0.001
Vitamin E							
α-tocopherol	18.48 ^b	17.13 ^a	29.31 ^a	6.54 ^c	5.76 ^c	2.00	< 0.001
γ-tocopherol	3.26 ^{ab}	ND	4.54 ^a	2.00 ^b	1.81 ^b	0.36	< 0.001

508 ^{a-c}Least squares means within a row without a common superscript differ ($P \leq 0.05$).

509 ¹Data are least squares means of 7 chickens; Vitamin concentrations are expressed in µg/mL in plasma and µg/g of fresh tissue.

510 ²ND = not detected.

511

512

513 **Table 5.** Chicken growth and carcass traits according to β,β -carotene 15,15'-monooxygenase 1 genotype and sex¹

514

Item	Genotype			Sex			P-value		
	AA	AG	GG	Male	Female	SEM	Genotype	Sex	Genotype × sex
BW at 63 d, g	1,679	1,672	1,695	1,883 ^a	1,482 ^b	13.29	NS	< 0.001	NS
Abdominal fat yield, %	2.30	2.31	2.28	2.11 ^b	2.49 ^a	0.14	NS	< 0.01	NS
Breast muscle yield, %	11.55	11.56	11.39	11.16 ^b	11.84 ^a	0.17	NS	< 0.001	NS

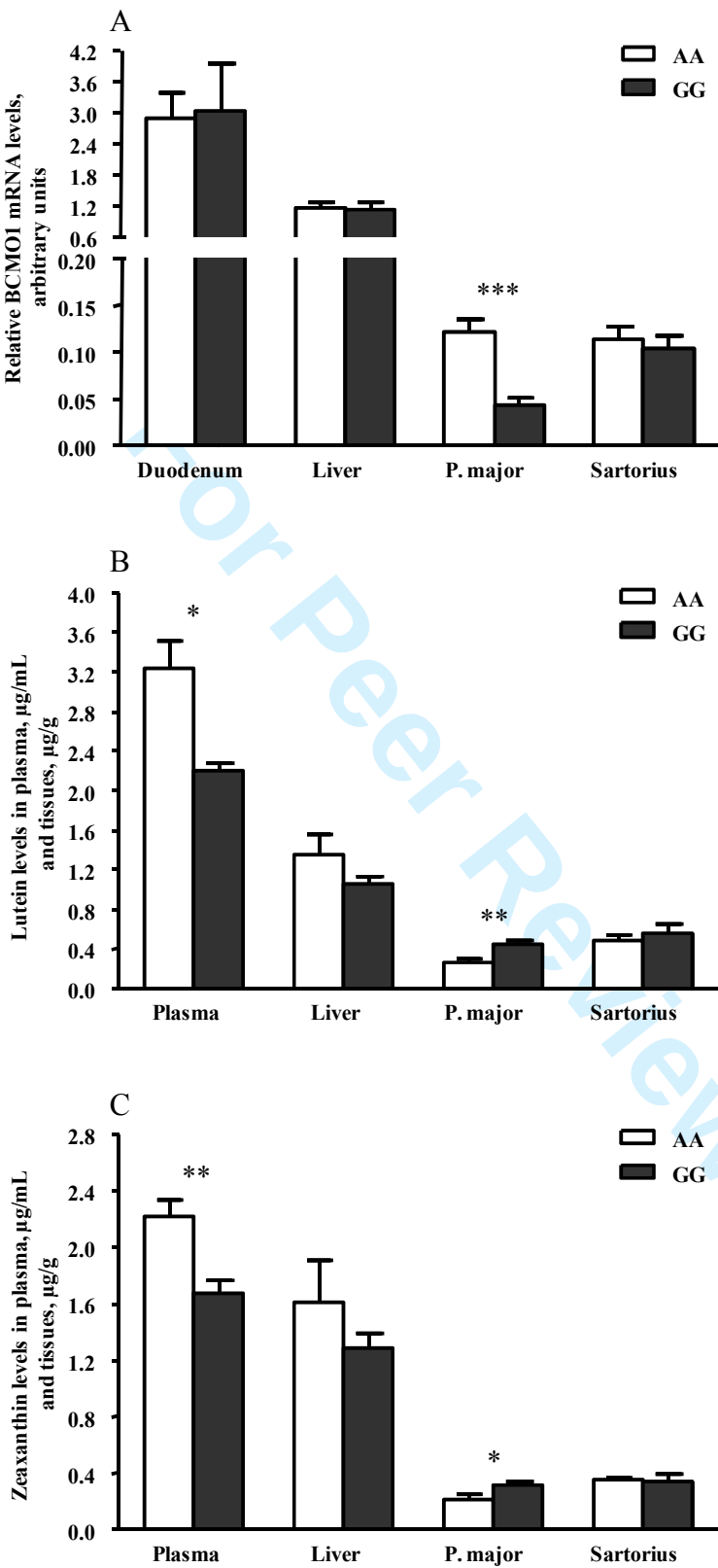
515 ^{a,b} Least squares means within a row without a common superscript differ ($P \leq 0.05$).

516 ¹Data are shown as least squares means of 18 AA, 33 AG, and 16 GG, and of 30 males and 37 females.

517

Figure 1

518



519

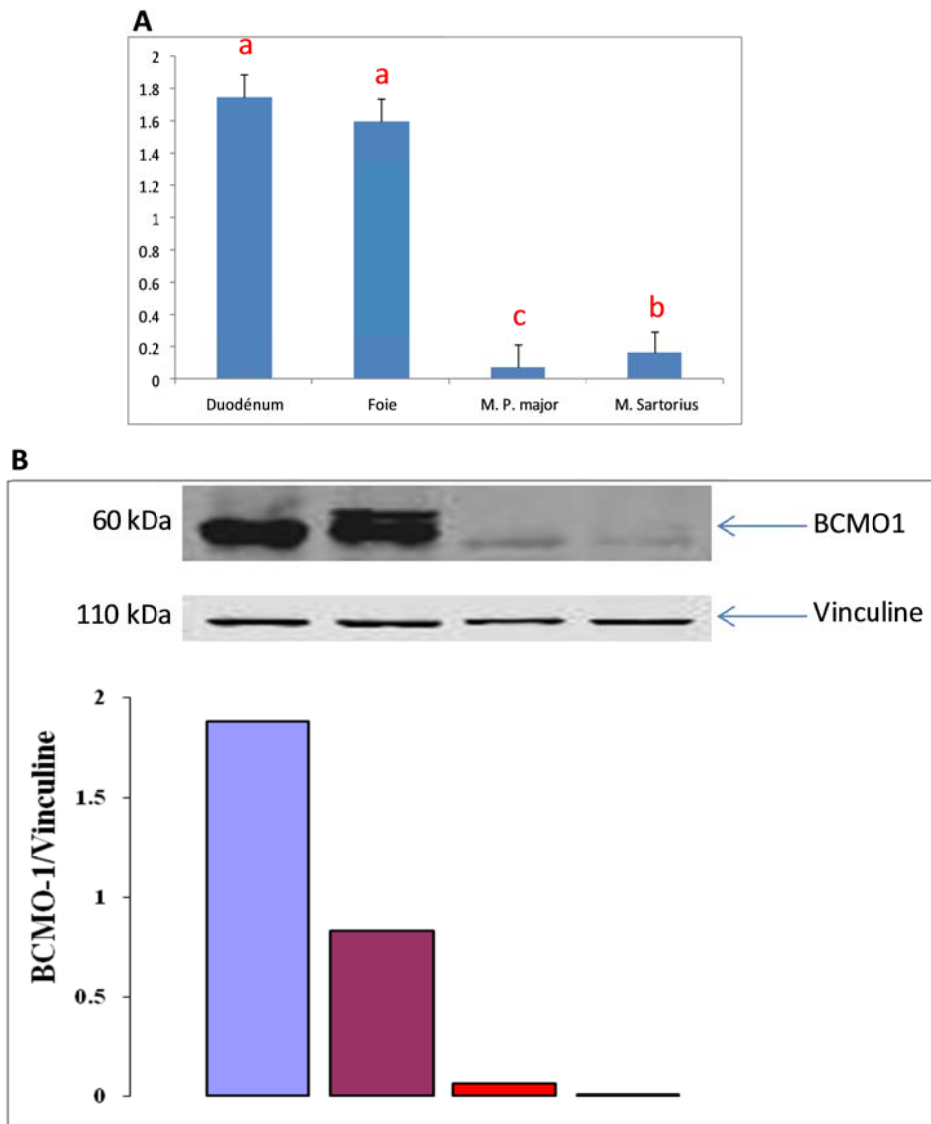


Figure 31. Variabilité inter-tissulaire de l'expression de BCMO1 (ARNm (A), protéine (B)).

```
>gi|50753878|ref|XP_414163.1| PREDICTED: beta-carotene 15,15'-monooxygenase
1 [Gallus gallus]
METIFNRNKEEHPEPIKAEVQGQLPTWLQGVLLRNGPGMHTIGDTKYNHWF DGLALLHSFTFKNGEVYR
SKYLRS DTYNCNIEANRIVVSEFGTMAYDPCKNIFAKAFSYLSHTIPEFTDNCLINIMKTGDDYYATSE
TNFIRKIDPQTLETLDKVDYSKYVAVNLATSHPHYDSAGNILNMGTSIVDKGR TKYVLFKIPSSVPEKEK
KKSCFKHLEVVC SIPSRSLLQPSYYHSFGITENYIVFIEQPFKLDIVKLATAYIRGVNWASCLSFHKEDK
TW FHFVDRKTKKEVSTKFYTDALVLYHHINAYEEDGHVVF D VAYRDN SLYDMFY LKKL DKDFEVNNKLT
SIPTCKRFVVPLQYDKDAEVGSNLVKLPTSATAVKEKDGS IYCQPEILCEGIELPRVNYDYNGKKYKYVY
ATEVQWSPVPTKIAKLN VQTKEVLHWGEDHCWPSEPIFVPSPDAREEDEGVV L TCVV VSEPNKAPFL LIL
DAKTFKELGRATVNVEMHLDLHG MFIPQNDLGAETE
```

Figure 32. Positionnement des peptides (en vert) qui ont servi à l'immunisation des lapins pour la production de l'anticorps polyclonal anti-BCMO1.

II.6. Discussion

II.6.1. Intérêt du modèle expérimental

La découverte de la mutation dans le promoteur du gène BCMO1 et les études d'association permettant de relier l'activité du gène aux variations de coloration ont été faites dans un croisement expérimental F2 entre deux lignées expérimentales se différenciant par la vitesse de croissance, la composition corporelle mais aussi de nombreuses caractéristiques métabolique et de qualité de viande (Nadaf et al., 2007, 2009). Par définition, ce type de croisement génère de la variabilité génétique qui est exploitée dans la recherche de QTL. D'ailleurs de nombreux QTL en lien avec des paramètres de croissance, métaboliques ou de qualité de viande ont été identifiés dans ce dispositif (Nadaf et al., 2007, 2009). Il était donc important de pouvoir étudier les effet de la mutation en comparant des individus porteurs des différents allèles (A ou G) mais possédant un fond génétique commun pour éviter de confondre des effets éventuellement liés aux caractéristiques des lignées d'origine (HG ou LG) notamment en terme de croissance et d'engraissement corporel.

II.6.2. Distribution tissulaire du gène BCMO1 chez le poulet

L'expression du gène BCMO1 est très variable selon les tissus (Figure 31). Il est exprimé à des niveaux élevés dans le duodénum et le foie et faiblement dans les muscles. Ces variations entre tissus ont été confirmées au niveau protéique par western blot. Nous avons en effet fait produire un anticorps polyclonal par la société Eurogentec en immunisant des lapins avec deux peptides de synthèse (Figure 32). Selon les bases de données, la protéine BCMO1 de poulet a un poids moléculaire de 60,4 kDa et un point isoélectrique (pI) de 6,01. L'anticorps reconnaît effectivement une bande (ou deux dans le cas du foie) à environ 60 kDa. L'analyse sur gel 2D révèle une complexité du signal plus importante dans le foie où 4 spots protéiques distincts sont reconnus par l'anticorps anti-BCMO1 (Figure 33). La position des spots correspond bien au pI connu de la protéine.

La distribution de BCMO1 entre tissus est conforme avec la littérature (Wyss et al., 2001 ; Lindqvist and Andersson, 2002 ; Takitani et al., 2006) et l'activité de clivage des

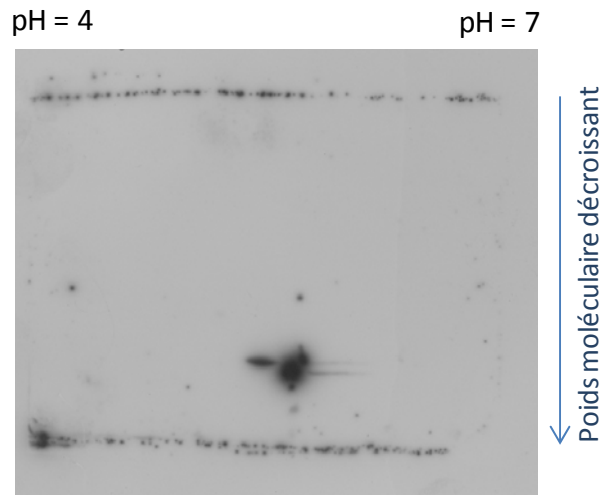


Figure 33. Electrophorèse 2D d'extrait protéique de foie de poulet (réalisée à l'UMR TANDEM, ENV Toulouse). Immunomarquage avec l'anticorps anti-BCMO1.

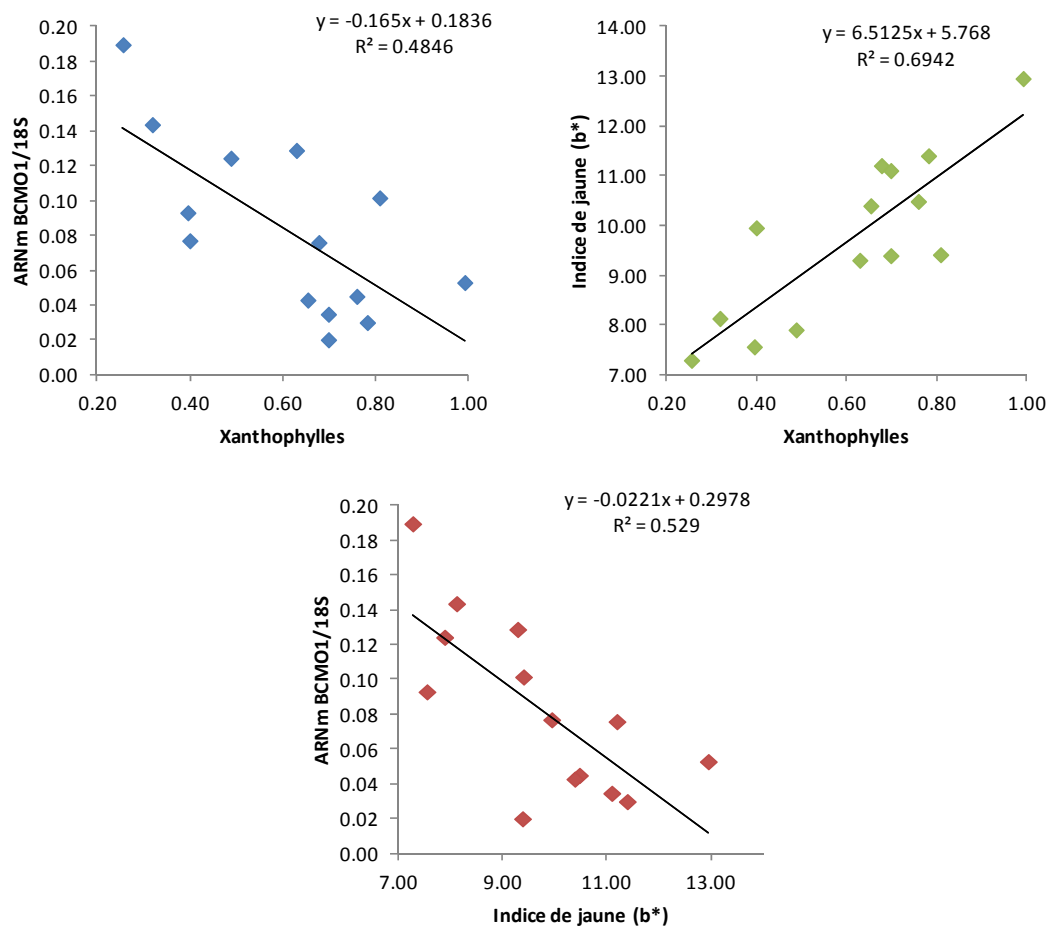


Figure 34. Corrélations entre les niveaux en ARNm de BCMO1 (relatif au 18S), la teneur en pigments xanthophylles (lutéine + zéaxanthine) et la couleur b* dans le muscle P. major du filet.

caroténoïdes (spécialement le β -carotène) de BCMO1 qui a lieu principalement au niveau intestinal, site d'absorption de ces micronutriments, et dans le foie, site de stockage principal de la vitamine A. Chez l'homme, il a été montré que la majeure partie du β -carotène est convertie en rétinol au niveau de l'intestin grêle (Parker, 1996). Ce qui reste est absorbé intact et déposé dans le foie ou les tissus adipeux où il sert de substrat pour la synthèse de la vitamine A en cas d'apport insuffisant de cette dernière (Lindqvist and Andersson, 2002). Comme cela avait préalablement été démontré chez l'homme (Lindqvist and Andersson, 2002) et le poulet (Le Bihan-Duval et al., 2011), BCMO1 est aussi faiblement exprimé dans les muscles squelettiques, avec des niveaux plus élevés dans le muscle oxydo-glycolytique *Sartorius* que dans le muscle purement glycolytique P. major. Cette différence peut être reliée à la teneur en lipides intramusculaires plus élevée du muscle *Sartorius*, site de dépôt potentiel pour les caroténoïdes.

Nous avons essayé de confirmer au niveau protéique le différentiel d'expression de BCMO1 dans le muscle P. major mais n'y sommes pas arrivés. Statistiquement les niveaux protéiques de BCMO1 entre animaux GG et AA ($n = 7$) étaient non différents. Il est possible que ce résultat soit dû au faible signal observé pour le muscle ou à l'inadéquation de la méthode western blot pour ce type d'analyse. En tous les cas, nous ne pouvons à ce jour affirmer que le différentiel exprimé au niveau ARNm existe au niveau protéique.

II.6.2. Mise en évidence d'un mode d'action de la mutation tissu-spécifique

Notre étude confirme que dans le muscle P. major, le polymorphisme à BCMO1 est associé avec un différentiel d'expression d'environ 3 fois au niveau du muscle P. major du filet (AA >> GG). De façon intéressante, ce différentiel d'expression n'est absolument pas retrouvé dans les autres tissus que nous avons étudiés (duodénum, foie, muscle *Sartorius*) qui pourtant expriment le gène à des niveaux plus élevés que le muscle P. major. D'ailleurs, en accord avec ces résultats les niveaux en lutéine et zéaxanthine ne sont pas modifiés dans ces tissus alors que dans le muscle P. major nous confirmons que le polymorphisme est associé à des variations de teneurs pour ces pigments et de coloration jaune (b^*) du filet. Le lien entre les niveaux d'expression en ARNm, la teneur en xanthophylles et la couleur jaune s'illustrent au travers de corrélations significatives entre ses différents caractères (Figure 34).

CTCTGCAATCACATGCTTTATATTGAAATAATTCTTTTCCTAGAGGATTTTAAAATTAAC
T3R-α
 AACATTGAACTCAGTTAAGTACCTTATCTTGAAAGAAATGCATGAAGTTAAAAATCCCCC
ATHB1
 TTCTTCTTAATTATTCCT**G/A**CCATACTTTTCGCAGAGGCTTCGAGTTGCTGATAACCAG**G/ATG**
c-Myc **VDR**
 GAATCAGATCACACGT**G/A**GGAGAATGTAGAATAGTGCCT**G/C**TTTGTAAGGAGGTGTTAATT
T3R-α
 CAAAGGTGTGCTGCTCAGTTCACTCTGGAAGTGTGTACCTAAAGAAAAAGCTCAT
T3R-α
 CATTGTT**CAGTGGT**GATATATTGTGAGTTAATAGAATAGCCCAGGTAAATTTGACTGAT
BRC1
 GACACTCCATCTGTCTATAAC**T/A**CCCAAGAAGACAATTCAGAATGGTGGGTAGAGCTTTCT
 CCTGTTTTTCTCCCTGCTCCTGCCAAGTGGG**G/A**CAGGCACCCCTACCAACAGCTCCGACTT
IRF1 **T3R-α**
 TCCCTGCAATGCTGAAGGTGATATTT**CAGTTTCATTTGC**TTTGGTGTGCCTGGCTGCC
C/EBPα
 TGAAGTAGCTTCACACAGAGCAAAGAGGTGAGCTATACTTTTCTTACTCTAACATCAAAT
 TAGTGAAAGAGTTAAAGGGACGTGCGAGAACTACTGTGTATGTGTAGGGATTAAAGATC
HNF4
 AACTGTTATAAGTTGTGATCTATAAGCCAGCAGCCACTAGCTCAAGTTGCACCTTAACC
T3R-β
 TCATCCTTCTATGTAACAGGAAAGAGCTGTTCTTAGCCAGAGAGGAGGG**G/C**ACCGCTACG
NHLH1
 CCTGCAGGAGCAGCTGGGTAGAGGACACAGGAGAGCG**ATG**GAGACAATATTTAACAGAAA
Myf
 CAAAGAAGAGCATCCAGA

Figure 35. SNP et site de fixation aux facteurs de transcription dans le promoteur de BCMO1. Les deux SNP fonctionnels sont indiqués en rouge. Les sites de fixation ont été prédits à l'aide du Transcription Element Search System (TESS) software (Schug, 2008). Abréviations: Up-stream factor (USF), interferon regulatory factor 1 (IRF1), T3-receptor alpha (T3R-α), transforming gene of avian myelocytomatosis virus (c-Myc), vitamin D3 receptor (VDR), CCAAT/enhancer binding protein (C/EBPα), hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4), T3-receptor beta (T3R-β), nescient helix loop helix 1 (NHLH1), myogenic factor (Myf), Arabidopsis thaliana homeobox 1 (ATHB1), bromodomain containing 1 (BRC1), retinoic acid receptor (RAR) and retinol activated receptor (RXR).

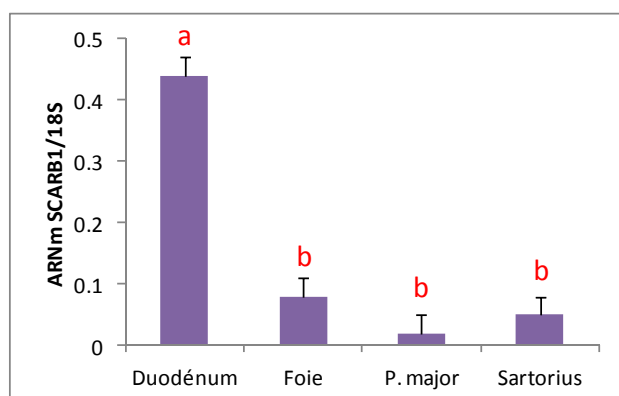
Notre étude suggère donc fortement un mode de régulation de la mutation qui serait tissu-spécifique. Une hypothèse serait que la double-mutation affecte un ou plusieurs sites de fixation à des facteurs de transcription dans le promoteur de BCMO1 qui serait spécifiquement actif au niveau du muscle P. major (rappelons que de façon très surprenante l'activité du gène n'est pas affecté dans le muscle *Sartorius*). L'analyse bioinformatique de la séquence du promoteur (Figure 35) montre qu'un des SNP se situe sur un élément de réponse c-Myc/VDR (transforming gene of avian myelocytomatosis virus/vitamin D3 Receptor) sans que pour l'instant nous n'ayons démontré l'implication de ce site particulier dans la régulation de l'expression de BCMO1. Il est toutefois intéressant de noter que l'absorption de la vitamine D et des caroténoïdes implique des acteurs communs comme par exemple les transporteurs de cholestérol, CD36 et SR-BI (Reboul et al., 2011).

Notre étude a aussi montré que la mutation affecte la teneur en xanthophylles du plasma dans le sens opposé (AA >> GG) à celui observé dans le muscle P. major. Il est donc probable que la mutation affecte le transport des caroténoïdes entre la circulation et les muscles pectoraux, avec des conséquences notables puisque ce tissu représente 12 % du poids corporel des poulets étudiés. Comme le montre la Figure 29, le transport des caroténoïdes du foie vers les tissus extra-hépatiques se fait *via* les LDL plasmatiques alors que leur élimination par ces tissus s'opère *via* les HDL. Les résultats de notre seconde étude concernant les variations de ces lipoprotéines en fonction du génotype nous aideront à mieux comprendre les différences plasmatiques observées entre les deux génotypes.

II.6.3. Comment la mutation affecte le statut en xanthophylles du muscle et du plasma ?

Comme expliqué précédemment, la littérature s'accorde pour dire que ni la lutéine ni la zéaxanthine ne présentent les caractéristiques chimiques nécessaires pour être clivées par BCMO1, en l'occurrence au moins un noyau β -ionone non substitué. Ainsi, les carotènes, la β -cryptoxanthine, les β -apo-carotenals (mais pas la lutéine, la zéaxanthine et le lycopène) sont clivés *in vitro* par des recombinants de BCMO1 (Lindquist et Andersson, 2002 ; Kim et Oh, 2008 ; Lietz et al., 2010). Une seule publication rapporte que la zéaxanthine pourrait être clivée par BCMO1 en un produit non identifié (Lakshman, 2004). Même si aucune donnée de

A



B

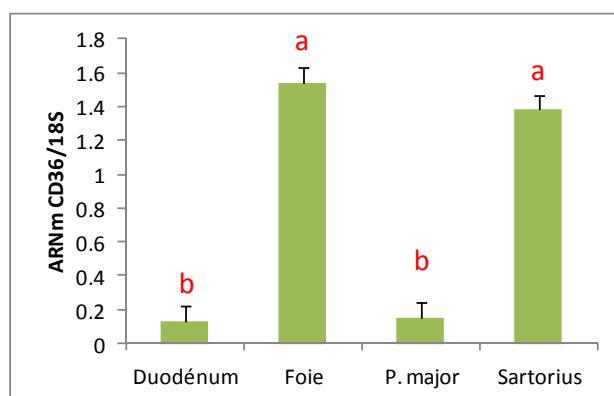


Figure 36. Variabilité inter-tissulaire de l'expression en ARNm de SCARB1 et CD36.

ce type n'est disponible (à notre connaissance) pour la lutéine, la possibilité d'une activité, même mineure, de BCMO1 sur ces deux xanthophylles n'est peut-être pas totalement à exclure.

Ce que l'on sait en revanche c'est qu'un certain nombre de caroténoïdes, non substrats de l'enzyme, peuvent inhiber le clivage du β -carotène par BCMO1 soit par compétition au niveau de l'absorption soit en affectant directement l'activité de l'enzyme. C'est le cas de la canthaxanthine, de la zéaxanthine, de la lutéine et du lycopène (Grolier et al., 1997 ; Van den Berg et van Vliet, 1998 ; Lietz et al., 2010). D'ailleurs les interactions compétitives ou non entre caroténoïdes pourraient expliquer pourquoi chez le poulet, comme chez l'homme, des variations génétiques de BCMO1 affecteraient les concentrations tissulaires ou plasmatiques de molécules comme la lutéine, la zéaxanthine ou le lycopène (Ferrucci et al., 2009 ; Borel et al., 2010).

Etant donné que les xanthophylles partagent un certain nombre de transporteurs avec le β -carotène, nous nous sommes intéressés à la régulation par la mutation de deux gènes : SCARB1 et CD36 qui codent respectivement pour le scavenger receptor class B type I (SR-BI) et le cluster déterminant 36. Selon nos résultats, SCARB1 est beaucoup plus exprimé dans le duodénum que dans les autres tissus étudiés (Figure 36A). Chez le rat (Johnson et al., 1998) et la tortue (Duggan et al., 2002), SCARB1 apparaît plus exprimé dans le foie que l'intestin grêle. Cette différence de résultat peut s'expliquer par le fait que nous avons extrait les ARN à partir de la muqueuse duodénale et non pas du duodénum entier, ce qui a pu concentrer la teneur en SCARB1 par rapport aux autres protéines du duodénum (notamment celles de la paroi musculaire). Quoi qu'il en soit, l'expression préférentielle de SCARB1 dans le duodénum est tout à fait cohérente avec la fonction de ce récepteur. De même l'expression préférentielle de CD36 dans des tissus riches en lipides (foie et muscle *Sartorius*) est cohérent avec le rôle de cette « fatty-acid translocase » dans les tissus adipeux (Love-Gregory et Abumrad, 2011) (Figure 36B). Cependant, quel que soit le tissu, l'expression de ces deux gènes n'est pas affectée par la mutation, ce qui ne plaide pas pour l'implication de ces transporteurs dans la régulation de la lutéine et la zéaxanthine lié au polymorphisme de BCMO1.

Récemment il a été montré que la lutéine et la zéaxanthine pouvait être clivée en apo-caroténoïdes par BCDO2, qui est aussi responsable du clivage asymétrique du β -carotène (Mein et al., 2011 ; Lobo et al., 2012). Toutefois, les niveaux d'expression de ce gène ne varient pas entre les génotypes AA et GG, ne plaçant pas non plus pour l'implication de BCDO2 pour expliquer les différences de teneurs en xanthophylles entre les deux génotypes. Il est par ailleurs à noter que l'expression de BCDO2, bien que la plus forte dans le duodénum, est extrêmement faible dans l'ensemble des tissus étudiés par comparaison aux autres gènes étudiés (BCMO1, SCARB1, CD36).

II.6.4. Implication de la mutation pour le statut vitaminique et le développement corporel des animaux.

L'enzyme BCMO1 a pour principale fonction de cliver le β -carotène en rétinol précurseur de la vitamine A et de l'acide rétinoïque. Dans les conditions de notre étude, la mutation à BCMO1 n'entraîne pas de modification des teneurs en vitamine A (rétinol ou formes estérifiées dans le foie) que ce soit dans les différents tissus testés ou le plasma. Cette observation est cohérente avec le fait que la quantité de β -carotène apportée par l'alimentation, même si elle n'a pu être évaluée, est probablement très faible au regard de la vitamine A contenu dans l'aliment. Dans ces conditions, les différences d'expression de BCMO1, même si elles affectent la proportion de β -carotène clivé ne vont pas impacter significativement la quantité de vitamine A circulante ou déposée dans les tissus. Nous pouvons donc conclure que les effets du polymorphisme sur l'expression du gène BCMO1 dans le muscle P. major sont un effet direct de la mutation qui n'implique pas un phénomène de rétro-contrôle *via* l'acide rétinoïque. En effet, l'acide rétinoïque provenant de la conversion du β -carotène ou des apports en vitamine A alimentaire préformée exercent un rétrocontrôle négatif sur l'activité du gène *via* notamment les éléments de réponse RXR (Retinoid X Receptor) et RAR (Retinoic Acid Receptor) (Bachmann et al., 2002 ; Lietz et al., 2010). Dans une expérience précédente comparant des individus AA et GG issus de la population F2 entre lignée HG et LG, des différences importantes de rétinol existaient au niveau du muscle entre génotypes (GG >> AA) qui par rétrocontrôle négatif pouvait participer au différentiel d'expression de BCMO1 observé entre génotypes (GG << AA). Notre étude utilisant des animaux ayant un fond génétique commun renforce l'hypothèse que la mutation est la cause des phénotypes observés (teneurs en pigments xanthophylles et couleur jaune du filet).

Puisque la vitamine E et les caroténoïdes partagent des voies de régulation communes nous avons vérifié si la mutation qui perturbe le statut en lutéine et zéaxanthine des animaux pouvait affecter celui en vitamine E. Ce n'est pas le cas. De même, dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas mis en évidence de répercussion sur la croissance, le développement musculaire ni l'adiposité abdominale des animaux. Chez la souris, il a été montré que la perte de fonction totale de BCMO1, suite à une invalidation du gène, abolit la production de vitamine A et perturbe le métabolisme lipidique (stéatose hépatique, augmentation des acides gras circulants non-estérifiés, propension augmentée à l'obésité) même en cas d'apport suffisant en vitamine A par l'alimentation (Hessel et al., 2007). Cette étude suggère donc un rôle important du β -carotène dans la régulation du métabolisme des lipides qui ne passerait pas forcément par la vitamine A. Des études plus récentes ont confirmé l'effet négatif du β -carotène sur la capacité de stockage en lipides des adipocytes impliquant BCMO1 (Lobo et al., 2010b; Amengual et al., 2011). Avec notre modèle génétique et les conditions nutritionnelles appliquées (à savoir un apport extrêmement limité en β -carotène), nous ne mettons pas en évidence d'effet particulier des variations d'expression de BCMO1 sur l'adiposité des animaux ni sur leur développement musculaire, qui pourtant est en partie contrôlé par l'acide rétinol au moment de la myogenèse (Alric et al., 1998 ; Hamade et al., 2006).

II.6.5. Conclusions et perspectives

Cette première expérience a permis de valider dans un modèle génétique spécifique l'implication des variations d'expression de BCMO1 sur la teneur en lutéine et zéaxanthine du muscle et la coloration jaune de la viande. Elle a par ailleurs permis de montrer que les effets du polymorphisme sont tissu-dépendants suggérant soit l'intervention de facteurs de transcription tissu-spécifiques dans la régulation de l'expression du gène soit que des interactions avec d'autres facteurs (nutritionnels par exemple) modulent l'impact de la mutation dans les autres tissus étudiés (duodénum, foie, etc.). C'est cette deuxième hypothèse que nous proposons de tester. Nous avons volontairement appauvri le régime des poulets en xanthophylles en remplaçant le maïs par le blé (moins pigmenté) et nous avons supplémenté ou non en β -carotène à raison de 10 mg/kg d'aliment (période de croissance de 3 à 9

semaines). L'apport en vitamine A préformée a été maintenu. Les animaux des deux génotypes ont été soumis aux deux types de régime pour déterminer :

- Comment l'apport en β -carotène module l'activité de BCMO1 ?
- Si l'effet du β -carotène est le même dans les deux génotypes ?
- Quelles sont les conséquences sur le métabolisme de l'animal en considérant :
 - le statut en caroténoïdes
 - les statuts en vitamines A et E
 - des paramètres lipidiques (métabolites sanguins, teneurs en lipides tissulaires)
 - l'expression des gènes intervenant dans le transport et le métabolisme du β -carotène (SCARB1, CD36, BCDO2).

II. 7. Principaux résultats de l'étude 2 (article 3)

THE JOURNAL OF NUTRITION

Official Publication of the American Society for Nutrition

The Journal of Nutrition
NUTRITION/2012/167338
Version 1

Nutrigenetics of carotenoid metabolism in the chicken: a polymorphism
at the BCMO1 locus affects the response to dietary ²-carotene

Maamer Jlali, Benoît Graulet, Béatrice Chauveau-Duriot, Estelle Godet,
Christophe Praud, Carlos Simões-Nunes, Elisabeth Le Bihan-Duval,
Cécile Berri, and Michel J Duclos

This paper includes additional materials for review purposes. To view additional materials, click on the [\[Download Supplemental Files\]](#) link available in the Full MS Info view of the manuscript. To reach this manuscript view, go to <http://submit.nutrition.org> , and log in to your account. Enter the Reviewer Area and click on [Active Reviews](#).

Instructions for Authors: <http://jn.nutrition.org/site/misc/ifora.xhtml>

Nutrigenetics of carotenoid metabolism in the chicken: a polymorphism at the BCMO1 locus affects the response to dietary β -carotene^{1,2,3}

Maamer Jlali⁴, Benoit Graulet⁵, Béatrice Chauveau-Duriot⁵, Estelle Godet⁴, Christophe Praud⁴, Carlos Simões Nunes⁶, Elisabeth Le Bihan-Duval⁴, Cécile Berri^{4*§} and Michel J. Duclos^{4§}

⁴ INRA, UR83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France

⁵ INRA, UMR1213 Herbivores, F-63122 St-Genès-Champanelle, France

⁶ DSM Nutritional Products France, NRD/CA, BP170, 68305 St-Louis Cedex, France

³ Supplementary Table 1 is available as Online Supporting Material with the online posting of this paper at <http://jn.nutrition.org>

RUNNING TITLE: Nutrigenetics and carotenoid metabolism

WORD COUNT: 5,398; NUMBER OF FIGURES: 1; NUMBER OF TABLES: 5

SUPPLEMENTARY MATERIAL: Online supporting material: 1

AUTHOR LIST FOR INDEXING: Jlali, Graulet, Chauveau-Duriot, Godet, Praud, Simões Nunes, Le Bihan-Duval, Berri, Duclos

¹ This project was funded by grants from INRA and from DSM nutritional products. Maamer Jlali is a PhD student supported by grant from the Government of Tunisia.

² Author disclosure: M. Jlali, B. Graulet, C. Praud, B. Chauveau-Duriot, E. Godet, C. Simões Nunes, E. Le Bihan-Duval, M. Duclos, C. Berri have no conflict of interest.

* To Whom Correspondence should be addressed, e-mail: Cecile.Berri@tours.inra.fr

§ Both authors contributed equally to this work.

26 ⁷ Abbreviations used: BCMO1(β , β -carotene-15,15'-monooxygenase 1), BCDO2 (β , β -
27 carotene-9',10'-dioxygenase), SCARB1 (SR-BI) (Scavenger receptor type 1 class B), CD36
28 (cluster determinant 36), HDL (high density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein),
29 RAR (retinoic acid receptor), RXR (retinoids X receptor), SNP (single nucleotide
30 polymorphism).

31

ABSTRACT

A polymorphism in the promoter of the BCMO1 gene induces differences in breast muscle color in the chicken that are related to tissue-specific variations in lutein and zeaxanthin and BCMO1 mRNA levels. Because lutein and zeaxanthin are not substrates of the BCMO1 enzyme, the link between variations in xanthophyll and BCMO1 activity remains unclear. We hypothesized that providing β -carotene in a wheat-based diet, thus limiting xanthophyll supply, should help to explain how BCMO1 affects xanthophyll status. Incorporation of β -carotene in the diet did not change the effects of the genotype (AA or GG) on breast muscle properties: BCMO1 mRNA levels were lower, lutein and zeaxanthin content higher, and color more yellow in GG than AA chickens. GG were also characterized by higher BCMO1 mRNA and lower vitamin E levels in the duodenum, and lower plasma cholesterol levels and body weight than AA chickens. The β -carotene supplementation exerted a negative effect on vitamin E levels in the plasma and tissues, on BCMO1 in the duodenum and liver, and on SCARB1 in the duodenum. It also increased retinol accumulation in the duodenum of AA and reduced xanthophyll levels in the duodenum, liver and plasma of GG whereas the effects of β -carotene on these parameters in the P. major muscle were similar in both genotypes. Taken together, these findings suggest that differences in competition between micronutrients for uptake, transport and storage would explain the complex effects of diet and genotype, and their interactions.

52 INTRODUCTION

53 Carotenoids are lipophilic pigments synthesized by plants, algae and some microorganisms.
 54 They are involved in various biological processes such as embryonic development (1),
 55 immunity (2), reproduction (3), and cell growth and differentiation (4), and are known as
 56 antioxidants (3, 5). Epidemiological studies have reported that carotenoids and their
 57 metabolites prevent several diseases, including cancers (6), cardiovascular diseases (7) and
 58 age-related macular degeneration (8). Because animals do not synthesize carotenoids, they
 59 must obtain them from their diet. Considerable amounts of carotenoids accumulate in organs
 60 and tissues in response to feed intake (9-11) and they have an important role in the
 61 determination of animal color (12). Several genetic polymorphisms have recently been
 62 identified that affect human and animal blood and tissue carotenoid status. In humans, several
 63 mutations or single nucleotide polymorphisms (SNP) associated with variations in carotenoid
 64 content affect the activity of β,β -carotene-15,15'-monooxygenase 1 (BCMO1), an enzyme
 65 responsible for the symmetrical cleavage of β -carotene into retinal (13-15). Polymorphisms
 66 (SNPs) have also been identified in the BCDO2 gene that encodes the β,β -carotene-9',10'-
 67 dioxygenase responsible for the asymmetric cleavage of carotenoids to apocarotenoids (16,
 68 17). They are also in proteins involved in lipid metabolism, including membrane transporters
 69 such as the scavenger receptor class B type I (SR-BI) and cluster determinant 36 (CD36),
 70 fatty acid-binding proteins and apolipoproteins (18-22).

71 In the chicken, two fully-linked single nucleotide polymorphisms (SNP) have also
 72 been identified within the proximal promoter of the BCMO1 gene at -678 and -621 upstream
 73 from ATG (23). This polymorphism is associated with differential expression of the BCMO1
 74 gene in *Pectoralis major* (P. major) muscle and is strongly related to variations in breast meat
 75 xanthophyll concentrations (lutein and zeaxanthin). The effects of the mutation have been
 76 further characterized by comparing chickens sharing a common genetic background but

differing in this specific mutation (24). Reared on a classical maize-based diet with no detectable amount of β -carotene, such birds showed marked differences in color, lutein and zeaxanthin content and BCMO1 mRNA levels in P. major muscle but not in other tissues. By contrast, these birds showed no differences in vitamin A and E status and no difference in the activity of other genes involved in carotenoid transport (SCARB1 and CD36) and metabolism (BCDO2). These results together indicated a new role for the BCMO1 enzyme in the regulation of xanthophyll metabolism in the muscle tissue which had not previously been identified (25, 26, 27). To elucidate the underlying mechanisms, the aim of the study presented here was to evaluate the physiological effects of providing β -carotene, the preferred substrate of the BCMO1 enzyme, in the broiler diet. We hypothesized that it should reveal the physiological consequences of polymorphism at the BCMO1 locus on pro- and non-pro-vitamin A carotenoids. The regulation of BCMO1, SCARB1, CD36 and BCDO2 was determined from the site of uptake (duodenum) to sites of accumulation (liver and skeletal muscle), and the effects on carotenoids, fat-soluble vitamins A and E, cholesterol, chicken growth, tissue yields and coloration were evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. Total RNA extraction reagent (RNA Now) was obtained from Ozyme (Saint-Quentin-en-Yvelines, France). DNase treatment using Ambion's DNA-Free 1906 Kit was obtained from Clinisciences (Montrouge, France), Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Superscript II) was purchased from Invitrogen (Illkirch, France) and random primers were obtained from Promega (Charbonnières les Bains, France). Real time PCR premix (SYBR® Green I qPCR Master Mix Plus) was obtained from Eurogentec (Angers, France). All-E- β -carotene, retinol, lutein, α -tocopherol, δ -tocopherol, γ -tocopherol, tocopheryl acetate, retinyl acetate, retinyl myristate, retinyl palmitate and retinyl stearate were purchased

from Sigma (Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Zeaxanthin, β -cryptoxanthin, echinenone, 9Z- β -carotene and 13Z- β -carotene were purchased from Carotenature (Lupsingen, Switzerland). All solvents used were UPLC grade and obtained from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Ultrapure water was prepared using a milli-Q system (Millipore, Millford, MA, USA).

Animals, housing, and diets. Two fully-linked SNPs were identified within the proximal promoter of the chicken BCMO1 gene at -678 and -621 upstream from the ATG codon (23, 28). They corresponded to the substitution of two adenins (A/A) by two guanins (G/G) and defined two haplotypes, AN₅₇A and GN₅₇G, which segregate within chicken lines maintained at INRA (Nouzilly, France). A total of 533 chicks were produced from 19 males and 70 females whose status at the BCMO1 locus was known. Genotype was determined by High-Resolution Melting (HRM) (23) from genomic DNA, extracted according to Nadaf et al. (29) from blood (breeders) or from two wing feathers removed at hatching (offspring). Because the two SNPs are fully-linked, the genotyping only took into account the SNP positioned -621 upstream from the ATG codon. Three genotypes were defined: homozygous AA and GG, and heterozygous AG.

From hatching to 3 wks, all chickens were reared in a conventional poultry house (23) and received the same wheat-based starter diet (**Table 1**). From 3 to 9 wks, only homozygous chickens were reared, representing 119 AA, of which 67 were females and 52 were males, and 92 GG, of which 60 were females and 32 were males. Chickens were equally and randomly distributed into two groups within each genotype and sex receiving a wheat-based diet with or without supplementation with 10 mg of β -carotene per kg of food (**Table 1**). The birds were individually weighed at hatching, and at 3, 6 and 9 wks of age. This study was

conducted in accordance with the European Union Guidelines for animal care and under authorization 37-112 delivered to C. Berri by the French Ministry of Agriculture.

Sampling and phenotyping. At 9 wks of age, chickens were weighed and slaughtered, and the carcasses were processed as described in Berri et al. (30). Blood samples were collected on heparin during bleeding and immediately chilled on ice. Blood samples were centrifuged at 3000xg at 4°C for 10 min, and serum was aliquoted and stored at -20°C until analyzed. Samples of duodenum mucosa, liver, and P. major muscle were collected 15 minutes post-mortem from 8 males and 8 females of each genotype (AA, GG) and diet (Control, β -carotene) then immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

All carcasses were processed 1 d after slaughter. Abdominal fat, breast muscles (*Pectoralis minor* and *Pectoralis major*) and liver were removed and weighed and their respective yields were calculated and expressed as percentage of live BW at slaughter. The lipid content of the liver and P. major muscle was determined according to Folch (31). The color of P. major muscle (internal part), duodenum (external face) and abdominal fat was measured by a Miniscan spectrophotometer (Hunterlab, Reston, VA) according to the CIELAB trichromatic system for lightness (L^*), redness (a^*), and yellowness (b^*) values 15 minutes post-mortem for the duodenum and 24h post-mortem for other tissues. The absorbance spectrum of the plasma was measured between 400 nm and 700 nm wavelengths by spectrophotometer (Tecan, Infinite M200). Each absorbance spectrum was translated to make the value at 530 nm equal to zero (32, 33). The color index (CI), which corresponds to the absolute value of the integral of the translated spectrum between 450 nm and 530 nm, was measured by calculating the trapezoid area (TA) between 450 nm and 530 nm as follows:

$$CI_{450-530nm} = TA_{450-460} + TA_{460-470} + TA_{470-480} + TA_{480-490} + TA_{490-500} + TA_{500-510} + TA_{510-520} + TA_{520-530}.$$

The values were only taken into account when the variation coefficient between three repetitions was less than 5%.

Quantitative PCR analysis. Total RNA was extracted from the duodenum, liver and P. major muscle of 8 females and 8 males from each treatment group (genotype x diet) and quantitative PCR (qPCR) was performed using cDNA synthesized as previously described (34). Primers were designed (**Supplementary Table 1**) and purchased from Eurogentec (Angers, France). qPCR assays were run on a Roche Lightcycler[®] 480 II using LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's recommendations. The qPCR conditions were 95°C for 5 min, followed by 45 cycles of 10 s at 95°C, 20 s at 60°C or 62°C, and 10 s at 72°C. The specificity of the qPCR reactions was assessed by analyzing the melting curves of the products and size and sequence verification of the amplicons. Each PCR run included negative control and unknown samples in triplicate. Samples were normalized internally by using simultaneously the average cycle quantification of three reference genes (18S, β -actin, and GAPDH) whose stability in all the selected tissues was investigated using the geNorm application (35). As recommended, the threshold for eliminating a gene was $M \geq 1$ (36). Expression levels were expressed as normalized values (35).

Biochemical analysis. Carotenoids and fat-soluble vitamins in plasma and tissues (duodenum, liver, and P. major muscle) were quantified by UPLC (Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) as described previously (37). After precipitation of proteins by ethanol, carotenoids and fat-soluble vitamins (A and E) were extracted from plasma and tissues by n-hexane and separated by UPLC. The analytical conditions for UPLC analysis were those recommended by Chauveau-Duriot et al. (37). In these conditions, carotenoids, and the entire vitamin A

(retinol and retinyl esters) and vitamin E (α - and γ -tocopherol) forms were quantified at 450, 325, and 292 nm, respectively. Quantification of the compounds was performed using Empower Pro software (Waters) and their corresponding concentrations were calculated by using an external standard curve. The concentrations obtained were adjusted according to the percentage of the added internal standard recovered.

Total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglyceride, glucose, and albumin concentrations were determined in plasma by enzymatic methods (Roche Diagnostics, Kaiseraugst, Switzerland) using an automated assay (Hitachi Cobas C 501, Roche Diagnostics, Kaiseraugst, Switzerland). Plasma minerals (Ca, Fe, Mg, P) were determined according to the AOAC method (38) using a Vista-MPX ICP OES spectrophotometer (Varian Australia Pty Ltd, Mulgrave Victoria, 3170 Australia).

Statistics. Data were analyzed by SAS 8.1 (SAS Inst. Inc., Cary, NC). The accepted type I error was 5%. The effects of BCMO1 genotype (AA vs. GG), diet (control vs. β -carotene) and their possible interactions were analyzed by a two-way ANOVA (GLM procedure) with type III sum of squares. Comparisons of means for each significant effect were performed by Tukey's test using the Least Square Mean statement of the GLM procedure. Data are presented as least square means $\pm$ SEM

RESULTS

Gene expression. Expression of BCMO1, BCDO2, SCARB1 and CD36 was detected in all the tissues tested (**Table 2**). The normalized expression of BCMO1 was affected by genotype and diet in a tissue-specific manner. The effects of genotype were the opposite of each other in the duodenum (AA < GG, $P = 0.003$) and in P. major muscle (AA >> GG, $P < 0.0001$), and absent in the liver. A significant effect of diet was observed in the duodenum ($P < 0.0001$)

and liver ($P = 0.004$) but not in P. major muscle. Addition of β -carotene to the diet lowered BCMO1 mRNA levels in the duodenum and liver. SCARB1 was not affected by genotype but was significantly decreased ($P < 0.0001$) in the β -carotene diet, but only in the duodenum. By contrast, BCDO2 and CD36 were invariable between genotypes and diets.

Carotenoid and vitamin status. As for mRNA, lutein and zeaxanthin concentrations were affected by genotype and diet in a tissue-specific manner (**Fig. 1**). Lutein and zeaxanthin were affected by genotype (AA < GG, $P < 0.001$) and diet in the P. major muscle, but without interaction: lutein and zeaxanthin were reduced ($P = 0.02$ and $P < 0.0001$, respectively) by β -carotene. Lutein and zeaxanthin plasma concentrations were lowered ($P < 0.05$) by β -carotene only in the GG genotype. Lutein was reduced by β -carotene in the duodenum ($P = 0.02$) and liver ($P = 0.03$) of GG. Zeaxanthin was absent in the liver and not regulated in the duodenum.

A number of vitamin A and vitamin E metabolites were affected by genotype or the incorporation of β -carotene in the diet, but the effects varied according to the tissue (**Table 3**). Lower concentrations of α - and γ -tocopherol were observed in the plasma ($P = 0.001$ and $P = 0.003$ for alpha and gamma, respectively) of GG chickens. α -tocopherol was also lower ($P = 0.02$) in the duodenum of GG. The concentration of α -tocopherol was lowered in the plasma ($P = 0.001$) and in the tissues ($P = 0.07$ in the duodenum, $P = 0.01$ in the liver, and $P = 0.001$ in P. major muscle) of chickens fed the β -carotene diet. By contrast, vitamin A metabolites increased in response to the β -carotene diet. Several forms of retinyl esters (the storage forms of vitamin A) were detected only in the liver. Myristate and palmitate ester content were increased ($P = 0.03$ and $P = 0.001$, respectively) following β -carotene supplementation. The retinol concentration was also increased (0.38 ± 0.03 vs. 0.25 ± 0.03 , $P < 0.05$) in response to β -carotene in the duodenum of the AA genotype.

Plasma metabolites and tissue lipid content. Of all the plasma metabolites measured, only cholesterol differed between genotypes (AA > GG, $P = 0.01$ for total cholesterol) (**Table 4**). For HDL-cholesterol, significant effects of genotype were observed ($P < 0.05$) in a genotype/diet interaction: HDL-cholesterol was higher in AA than GG when fed the β -carotene diet (124.0 ± 3.4 vs. 108.6 ± 3.4 , $P = 0.01$). A slight decrease ($P < 0.05$) in calcium was also observed following β -carotene supplementation. The lipid content of the liver and P. major muscle was unaffected by genotype or diet.

Growth, body composition and color parameters. Body weight at slaughter was higher ($P = 0.02$) in AA than GG but not affected by diet (**Table 5**). Body yields were affected by both genotype and diet. Breast muscle yields were lower ($P = 0.01$) in AA than in GG chickens and a trend to higher values was observed following β -carotene supplementation ($P = 0.06$). Dietary β -carotene increased leg yield ($P = 0.002$) and decreased abdominal fat yield ($P = 0.03$). The P. major muscle was more yellow ($P = 0.03$) in GG than in AA chickens. The color index for plasma was decreased (7.46 vs. 10.31, $P < 0.0001$) by β -carotene in the GG genotype.

DISCUSSION

By selecting chicken breeders of a pure line for their status at the BCMO1 locus, we were able to produce offspring homozygous (AA or GG) for this specific mutation but sharing a common genetic background. This model is particularly pertinent to evaluate the consequences of variations in BCMO1 expression on chicken growth and metabolism in different nutritional conditions (presence or absence of β -carotene). The effects of genotype on breast meat yellow color were confirmed in such conditions, without interaction with the dietary supply of β -carotene. However, the extent of the difference was less than in previous

250 experiments (23, 24), which is consistent with the lower lutein and zeaxanthin levels in the
251 plasma, breast muscle and other tissues measured in the present experiment. Lower dietary
252 supply of these xanthophylls from a wheat-based (instead of corn) diet was the likely
253 explanation for these differences. Nevertheless, lutein and zeaxanthin content (AA<GG), and
254 BCMO1 mRNA level (AA>GG) in the P. major muscle significantly differed between
255 genotypes in both nutritional conditions. A significant effect of genotype, without interaction
256 with diet, was recorded for a number of traits which did not differ in the previous experiment
257 (24). We observed a significant effect of genotype on overall growth (AA > GG) and breast
258 muscle yield (AA < GG). Plasma concentrations of vitamin E derivatives α - and γ -tocopherol
259 and duodenal content of α -tocopherol were significantly higher in AA than GG. The
260 differences between the results of the experiments could be explained by the increased
261 statistical power due to the greater number of animals studied in the present experiment or
262 might be the consequences of the reduced xanthophyll content of the diet. Competition
263 phenomena are known to occur between different carotenoids, and between carotenoids and
264 other nutrients (including cholesterol and vitamin E) during intestinal absorption, transport
265 and accumulation (11, 39, 40). Depending on the supply of xanthophylls in the diet, AA
266 exhibited increased (Experiment 1, high xanthophylls) or similar levels of plasma
267 xanthophylls (Experiment 2, low xanthophylls) in comparison to GG. The comparatively
268 decreased xanthophyll incorporation in the AA genotype may therefore result in increased
269 absorption of vitamin E, and as a consequence, the higher plasma and tissue vitamin E levels
270 in the present experiment. Total plasma cholesterol, which had not been measured before, was
271 also affected by genotype (AA > GG), which is consistent with the fact that carotenoids,
272 vitamin E and cholesterol share similar transport mechanisms (41, 42). A significant effect of
273 genotype on BCMO1 mRNA level in the duodenum was also observed in the study presented

here, although it was the opposite (AA<GG) and of lower amplitude than in the P. major muscle.

This experiment was also the first to investigate the effects of β -carotene supplementation in the chicken. Numerous parameters were consistently affected in both genotypes. Dietary β -carotene markedly reduced abdominal fatness and slightly increased leg and breast yield without affecting overall chicken growth. The effects of β -carotene, a pro-vitamin A carotenoid, on body fatness are consistent with previous results showing that β -carotene reduces the lipid storage capacity of adipocytes in a BCMO1-dependent manner (43, 44), suggesting a vitamin A-dependent mechanism. Interestingly, a reduction in calcium was also observed in the plasma of chickens supplemented with β -carotene. It has already been shown that vitamin A antagonizes the calcium response to vitamin D in man (45). Two forms of retinyl ester (but not retinol) were increased in the liver in response to β -carotene supplementation in the diet. By contrast, concentrations of α -tocopherol in the plasma and all tissues, as well as lutein (0.20 vs. 0.22) and zeaxanthin (0.12 vs. 0.15) in the P. major muscle, were decreased by β -carotene. BCMO1 gene activity was negatively regulated by dietary β -carotene in the duodenum and liver, but not in P. major muscle. Several studies have reported a negative control of BCMO1 gene expression or enzyme activity by pro-vitamin A carotenoids, and/or vitamin A or its derivatives, such as retinoic acid (RA), especially in the intestinal tract (46-48). This negative feedback is mediated by retinoid receptors (RAR and RXR) (46, 49). A decline in SCARB1 mRNA levels in the duodenum was also observed in response to dietary β -carotene. A common regulatory pathway for these two genes has previously been described in the intestines, involving the ISX response element (48, 50).

However, incorporation of β -carotene in the diet also revealed further differences between genotypes. A significant increase in retinol in the duodenum was observed in response to dietary β -carotene in AA chickens. As BCMO1 mRNA levels in the duodenum

were lower in AA than in GG, we have no direct evidence that it could result from a higher level of conversion of β -carotene by the BCMO1 enzyme. The well described negative feedback of retinoids on BCMO1 gene activity could however explain the lower BCMO1 mRNA levels observed in the duodenum of AA compared to GG chickens. Significant interactions between genotype and diet were also observed for lutein concentrations in the plasma, liver and duodenum and for zeaxanthin in the plasma. These concentrations were similar between genotypes in the control conditions and significantly decreased by β -carotene only in the GG genotype. Due to competition between metabolites, increased supply of β -carotene to the intestinal cells could result in lower intake of xanthophylls, vitamin E derivatives and cholesterol, which might be reflected by the lower levels of all those metabolites in the plasma or tissues of chickens supplemented with β -carotene. Such competition may however differ according to the genotype. Although β -carotene could not be quantified, the increased concentration of retinol observed in the duodenum of AA chickens following β -carotene supplementation may lower the available β -carotene concentration and reduce this competitive effect in AA. In GG, the competitive effect may be maximal, explaining why lutein and zeaxanthin plasma concentrations, duodenum and liver lutein content and circulating HDL-cholesterol showed a stronger response to β -carotene supplementation.

By comparing genetic variants at the BCMO1 locus in chicken fed a wheat-based diet with low levels of xanthophylls, with or without β -carotene supplementation, we confirmed differential BCMO1 gene expression in the P. major muscle, but found different levels of regulation in the duodenum and liver. This experimental approach highlighted a marked genetic effect on vitamin E metabolism and chicken growth rate. Supplementation with β -carotene exerted negative regulation of vitamin E levels in the plasma and tissues, of BCMO1

levels in duodenum and liver, and of SCARB1 in the duodenum, whereas the effects of β -carotene supplementation in the P. major muscle were similar in both genotypes, resulting in lower xanthophyll content in the plasma, liver and duodenum of GG. Competition between micronutrients for uptake, transport and storage appeared to be the central mechanism explaining the complex effects of diets differing in β -carotene or xanthophyll levels, of genotypes, and of their interactions.

ACKNOWLEDGMENTS

C.B., M.J.D., E.L.B.D designed the research; M.J., C.B., B.G., B.C.D, E.G., and C.S.N. conducted the research; C.B., M.J., and B.G. analyzed the data; C.B., M.J., M.J.D. wrote the paper; and C.B. and M.J.D have the main responsibility for the final content. All authors read and approved the final manuscript. We thank M. Lessire for formulating the diets; P. Chartrin for measuring tissue lipid contents; and the staff of the poultry breeding facilities (INRA, UE 1295 Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours, F-37380 Nouzilly, France) and the avian research unit (INRA, UR83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France) for technical assistance.

Literature cited

1. Mora O, Kuri-Melo L, González-Gallardo A, Meléndez Z, Morales A, Shimada A, Varela-Echavarria A. A potential role of β -carotene in avian embryonic development. *Int J Vitam Nutr Res*. 2004;74:116-122.
2. Koutsos EA, Clifford AJ, Calvert CC, Klasing KC. Maternal carotenoid status modifies the incorporation of dietary carotenoids into immune tissues of growing chickens (*Gallus gallus domesticus*). *J Nutr*. 2003;133:1132-1138.
3. Surai PF. Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction. Nottingham University Press, England, 2002.
4. Lampert JM, Holzchuh J, Hessel S, Driever W, Vogt K, von Lintig J. Provitamin A conversion to retinal via the β,β -carotene-15,15'-oxygenase (bcox) is essential for pattern formation and differentiation during zebrafish embryogenesis. *Development*. 2003;130:2173-2186.
5. Müller L, Fröhlich K, Böh V. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chem*. 2011;129:139-148.
6. Wang Y, Ausman LM, Greenberg AS, Russell RM, Wang XD. Dietary lycopene and tomato extract supplementations inhibit nonalcoholic steatohepatitis promoted hepatocarcinogenesis in rats. *Int J Cancer*. 2010;126:1788-1796.
7. Voutilainen S, Nurmi T, Mursu J, Rissanen TH. Carotenoids and cardiovascular health. *Am J Clin Nutr*. 2006;83:1265-1271.
8. Krinsky NI, Landrum JT, Bone RA. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. *Annu Rev Nutr*. 2003;23:171-201.

9. Na JC, Song JY, Lee BD, Lee SJ, Lee CJ, An GH. Effect of polarity on absorption and accumulation of carotenoids by laying hens. *Anim Feed Sci Technol*. 2004;117:305-315.
10. Chung HY, Ferreira AL, Epstein S, Paiva SA, Castaneda-Sceppa C, Johnson EJ. Site-specific concentrations of carotenoids in adipose tissue: relations with dietary and serum carotenoid concentrations in healthy adults. *Am J Clin Nutr*. 2009;90:533-539.
11. Wang Y, Illingworth DR, Connor SL, Duell PB, Connor WE. Competitive inhibition of carotenoid transport and tissue concentrations by high dose supplements of lutein, zeaxanthin and beta-carotene. *Eur J Nutr*. 2010;49:327-336.
12. Bhosale P, Bernstein PS. Vertebrate and invertebrate carotenoid-binding proteins. *Arch Biochem Biophys*. 2007;458:121-127.
13. Lindqvist A, Sharvill J, Sharvill, DE, Andersson S. Loss-of-function mutation in carotenoid 15,15'-monooxygenase identified in a patient with hypercarotenemia and hypovitaminosis A. *J Nutr*. 2007;137:2346-2350.
14. Ferrucci L, Perry JRB, Matteini A, Perola M, Tanaka T, Silander K. Common variation in the β -carotene 15,15'-monooxygenase 1 gene affects circulating levels of carotenoids: A genome-wide association study. *Am J Human Genet*. 2009;84:123-133.
15. Borel P, De Edelenyi FS, Vincent-Baudry S, Malezet-Desmoulin C, Margotat A, Lyan B, Gorrand, J-M, Meunier N, Drouault-Holowacz S, Bieuvelet S. Genetic variants in BCMO1 and CD36 are associated with plasma lutein concentrations and macular pigment optical density in humans. *Ann Med*. 2011;43:47-59.
16. Tian R, Pitchford WS, Morris CA, Cullen NG, Bottema CDK. Genetic variation in the β , β -carotene-9',10'-dioxygenase gene and association with fat colour in bovine adipose tissue and milk. *Anim Genetics*. 2009;41:253-259.

17. Våge DI, Boman, IA. A nonsense mutation in the beta-carotene oxygenase 2 (BCO2) gene is tightly associated with accumulation of carotenoids in adipose tissue in sheep (*Ovis aries*). *BMC Genet.* 2010;11:10.
18. Ortega H, Castilla P, Gomez-Coronado D, Garces C, Benavente M, Rodriguez-Artalejo F, de Oya M, Lasuncion MA. Influence of apolipoprotein E genotype on fat-soluble plasma antioxidants in spanish children. *Am J Clin Nutr.* 2005;81:624-632.
19. Herron KL, McGrane MM, Waters D, Lofgren IE, Clark RM, Ordovas JM, Fernandez ML. The ABCG5 polymorphism contributes to individual responses to dietary cholesterol and carotenoids in Eggs. *J Nutr.* 2006;136:1161-1165.
20. Borel P, Moussa M, Reboul E, Lyan B, Defoort C, Vincent-Baudry S, Maillot M, Gastaldi M, Darmon M, Portugal H, Planells R, Lairon D. Human plasma levels of vitamin E and carotenoids are associated with genetic polymorphism in genes involved in lipid metabolism. *J Nutr.* 2007;137:2653-2659.
21. Borel P, Moussa M, Reboul E, Lyan B, Defoort C, Vincent-Baudry S, Maillot M, Gastaldi M, Darmon M, Portugal H, Lairon D, Planells R. Human fasting plasma concentrations of vitamin E and carotenoids, and their association with genetic variants in apo C-III cholesteryl ester transfer protein, hepatic lipase, intestinal fatty acid binding protein and microsomal triacylglycerol transfer protein. *Br J Nutr.* 2009;101:680-687.
22. Borel P. Genetic variations involved in interindividual variability in carotenoid status. *Mol Nutr Food Res.* 2012;56:228-240.
23. Le Bihan-Duval E, Nadaf J, Berri C, Pitel F, Graulet B, Godet E, Leroux SY, Demeure O, Lagarrigue S, Duby C, Cogburn LA, Beaumont CM, Duclos MJ. Detection of a Cis eQTL controlling BCMO1 gene expression leads to the identification of a QTG for chicken breast meat color. *Plos One.* 2011;6, doi:10.1371/journal.pone.0014825.

24. Jlali M, Graulet B, Chauveau-Duriot B, Chabault M, Godet E, Leroux S, Praud C, Le Bihan-Duval E, Duclos MJ, Berri C. A mutation in the promoter of the chicken BCMO1 gene alters xanthophyll metabolism through a selective effect on its mRNA levels in the breast muscle. *J Anim Sci.* 2012; in press.
25. Lindqvist A, Andersson S. Biochemical properties of purified recombinant human beta-carotene 15,15'-monooxygenase. *J Biol Chem.* 2002;277:23942-23948.
26. Lakshman MR. Alpha and omega of carotenoid cleavage. *J Nutr.* 2004;134:241S-245S.
27. Kim YS, Oh DK. Substrate specificity of a recombinant chicken beta-carotene 15,15'-monooxygenase that converts beta-carotene into retinal. *Biotechnol Lett.* 2009;31:403-408.
28. Le Bihan-Duval E, Nadaf J, Berri C, Duclos MJ, Pitel F. 2010. Marqueurs génétiques pour la coloration de la viande. License deposit 2008/08/25; n° EP2161345A1.
29. Nadaf J, Gilbert H, Pitel F, Berri C, Fève K, Beaumont C, Duclos MJ, Vignal A, Porter TE, Simon J, Aggrey SE, Cogburn LA, Le Bihan-Duval E. Identification of QTL controlling meat quality traits in an F₂ cross between two chicken lines selected for either low or high growth rate. *BMC Genomics.* 2007;8:155.
30. Berri C, Le Bihan-Duval E, Debut M, Santé-Lhoutellier V, Baéza E, Gignaud V, Jégo Y, Duclos MJ. Consequence of muscle hypertrophy on Pectoralis major characteristics and breast meat quality of broiler chickens. *J Anim Sci.* 2007;85:2005-2011.
31. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957;226:497-509.
32. Nozière P, Grolier P, Durand D, Ferlay A, Pradel P, Martin B. Variations in carotenoids, fat-soluble micronutrients, and color in cows' plasma and milk following changes in forage and feeding level. *J Dairy Sci.* 2006;89:2634-2648.

33. Calderón F, Chauveau-Duriot B, Pradel P, Martin B, Graulet B, Doreau M, Nozière P. Variations in carotenoids, vitamins A and E, and color in cow's plasma and milk following a shift from hay diet to diets containing increasing levels of carotenoids and vitamin E. *J Dairy Sci.* 2007;90:5651-5664.
34. Sibut V, Le Bihan-Duval E, Tesseraud S, Godet E, Bordeau T, Cailleau-Audouin E, Chartrin P, Duclos MJ, Berri C. AMP-activated protein kinase involved in the variations of muscle glycogen and breast meat quality between lean and fat chickens. *J Anim Sci.* 2008;86:2888-2896.
35. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002; 18:3(7).
36. Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 2007;8:R19.
37. Chauveau-Duriot B, Doreau M, Nozière P, Graulet B. Simultaneous quantification of carotenoids, retinol, and tocopherols in forages, bovine plasma, and milk: validation of a novel UPLC method. *Anal Bioanal Chem.* 2010;397:777-790.
38. AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th edition. Washington, DC, Association of Official Analytical Chemists, 1990.
39. van den Berg H, van Vliet T. Effect of simultaneous, single oral doses of β -carotene with lutein or lycopene on the β -carotene and retinyl ester responses in the triacylglycerol-rich lipoprotein fraction of men. *Am J Clin Nutr.* 1998;68:82-89.
40. Mamatha BS, Baskaran V. Effect of micellar lipids, dietary fiber and β -carotene on lutein bioavailability in aged rats with lutein deficiency. *Nutrition.* 2011;27:960-966.

41. van Bennekum A, Werder M, Thuahnai ST, Han C-H, Duong P, Williams DL, Wettstein P, Schulthess G, Phillips MC, Hauser H. Class B scavenger receptor-mediated intestinal absorption of dietary β -carotene and cholesterol. *Biochemistry*. 2005;44:4517-4525.
42. Reboul E, Klein A, Bietrix F, Gleize B, Malezet-Desmoulins C, Schneider M, Margotat A, Lagrost L, Collet X, Borel P. Scavenger receptor class B type I (SR-BI) is involved in vitamin E transport across the enterocyte. *J Biol Chem*. 2006; 281:4739-4745.
43. Lobo GP, Amengual J, Li HN, Golczak M, Bonet ML, Palczewski K, von Lintig J. Beta, beta-carotene decreases peroxisome proliferator receptor gamma activity and reduces lipid storage capacity of adipocytes in a beta, beta-carotene oxygenase 1-dependent manner. *J Biol Chem*. 2010a;285:27891-27899.
44. Amengual J, Gouranton E, van Helden YG, Hessel S, Ribot J, Kramer E, Kiec-Wilk B, Razny U, Lietz G, Wyss A, Dembinska-Kiec A, Palou A, Keijer J, Landrier JF, Bonet ML, von Lintig J. Beta-carotene reduces body adiposity of mice via BCMO1. *Plos One*. 2011;6:e20644.
45. Johansson S, Melhus H. Vitamin A antagonizes calcium response to vitamin D in man. *J Bone Mineral Res*. 2001;16:1899-1905.
46. Bachmann H, Desbarats A, Pattison P, Sedgewick M, Riss G, Wyss A, Cardinault N, Duszka C, Goralczyk R, Grolier P. Feedback regulation of beta, beta-carotene 15, 15'-monooxygenase by retinoic acid in rats and chickens. *J Nutr*. 2002;132:3616-3622.
47. Wyss A. Carotene oxygenases: a new family of double bond cleavage enzymes. *J Nutr*. 2004;134:246S-250S.
48. Lobo GP, Hessel S, Eichinger A, Noy N, Moise AR, Wyss A, Palczewski K, von Lintig J. ISX is a retinoic acid-sensitive gatekeeper that controls intestinal β , β -carotene absorption and vitamin A production. *FASEB J*. 2010b;24:1656-1666.

49. Takitani K, Zhu CL, Inoue A, Tamai H. Molecular cloning of the rat β -carotene 15,15'-monooxygenase gene and its regulation by retinoic acid. *Eur J Nutr.* 2006;45:320-326.
50. Lietz G, Lange J, Rimbach G. Molecular and dietary regulation of β,β -carotene 15,15'-monooxygenase 1 (BCMO1). *Arch Biochem Biophys.* 2010;502:8-16.

Legends

FIGURE 1 Effects of genotype or diet on lutein (**A**) and zeaxanthin (**B**) concentrations in the P. major muscle. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$. Lutein (**C**) and zeaxanthin concentrations (**D**) in the plasma, liver and duodenum of AA or GG chickens fed the control or the β -carotene-supplemented diet. Lsmeans without a common letter differed within a tissue or plasma, $P < 0.05$; genotype effect, g; diet effect, d; genotype $\times$ diet interaction effect, g $\times$ d. Values are lsmeans $\pm$ pooled SE, $n = 16$ per treatment. nd (not detected).

Table 1 Composition and characteristics of chicken starter (0 to 3 wks) and growth (3 and 9 wks) diets

Ingredients	Starter	Growth	
		Control	β -carotene
		<i>g/kg</i>	
Wheat	491.0	541.7	540.7
Soybean meal	225.5	162.9	162.9
Pea	80.0	100.0	100.0
Starch corn	50.0	50.0	50.0
Extruded soybeans	50.0	50.0	50.0
Rapeseed oil	33.9	32.3	32.3
Wheat gluten	30.0	30.0	30.0
Dicalcium phosphate	16.2	13.7	13.7
Calcium carbonate	11.6	8.4	8.4
Salt (NaCl)	3.0	3.0	3.0
L-Lysine HCl	2.0	1.3	1.3
DL-Methionine	1.7	1.7	1.7
Threonine	0.1	0.0	0.0
Premix	5.0	5.0	5.0
β -carotene	0.0	0.0	0.01
Calculated content		<i>MJ/kg</i>	
Metabolizable energy	12.33	12.54	12.54
		<i>g/kg</i>	
Crude protein	215.00	200.00	200.00
Lysine	12.03	10.21	10.21
Methionine	4.74	4.47	4.47
TSAA	8.54	8.02	8.02
Threonine	7.62	6.72	6.72
Tryptophan	2.53	2.26	2.26
Leucine	15.20	13.73	13.73
Isoleucine	8.94	7.98	7.98
Arginine	12.93	11.43	11.43
Valine	9.71	8.75	8.75
Calcium	11.08	9.01	9.01
Available phosphorus	4.22	3.80	3.80

Table 2 Normalized mRNA levels of BCMO1, BCDO2 and SCARB1 genes in relation to genotype and dietary β -carotene in various tissues of 63-d-old chickens¹

	Genotype (g)		P-value	Diet (d)		P-value	g $\times$ d	SE ²
	AA	GG		Control	β -carotene			
Duodenum								
BCMO1	0.20	0.27	0.003	0.29	0.18	<0.0001	NS	0.03
BCDO2	0.28	0.25	NS	0.27	0.26	NS	NS	0.03
SCARB1	0.23	0.29	NS	0.36	0.16	<0.0001	NS	0.04
CD36	0.22	0.22	NS	0.20	0.24	NS	NS	0.04
Liver								
BCMO1	0.44	0.51	NS	0.55	0.41	0.004	NS	0.05
BCDO2	0.38	0.40	NS	0.38	0.39	NS	NS	0.05
SCARB1	0.40	0.40	NS	0.43	0.36	NS	NS	0.05
CD36	0.55	0.59	NS	0.55	0.59	NS	NS	0.03
<i>Pectoralis major</i> muscle								
BCMO1	0.57	0.25	<0.0001	0.40	0.42	NS	NS	0.03
BCDO2	0.37	0.45	NS	0.40	0.43	NS	NS	0.05
SCARB1	0.30	0.34	NS	0.30	0.34	NS	NS	0.04
CD36	0.33	0.27	NS	0.28	0.31	0.002	0.001	0.05

¹Data were normalized internally using three reference genes simultaneously (18S, β -actin, and GAPDH) whose stability in all the selected tissues was investigated using the geNorm application (32). Data are given as lsmeans, $n = 32$ per genotype or diet. Not significant, NS; β , β -carotene 15,15'-monooxygenase, BCMO1; β , β -carotene 9',10'-dioxygenase, BCDO2; Scavenger receptor class B type 1, SCARB1.

²Pooled SE of treatment groups.

Table 3 Concentrations of vitamin A and E metabolites in relation to genotype and dietary β -carotene in several tissues and plasma of 63-d-old chickens¹

	Genotype (g)		<i>P</i> -value	Diet (d)		<i>P</i> -value	<i>g</i> $\times$ <i>d</i>	SE ²
	AA	GG		Control	β -carotene			
Plasma				$\mu\text{g/ml}$				
Retinol	1.80	1.75	NS	1.75	1.81	NS	NS	0.06
Alpha-tocopherol	29.9	21.9	0.001	30.08	21.73	0.001	NS	2.38
Gamma-tocopherol	1.29	1.00	0.003	1.21	1.08	NS	NS	0.09
Duodenum				$\mu\text{g/g}$				
Retinol	0.32	0.29	NS	0.28	0.33	NS	0.01	0.03
Alpha-tocopherol	6.85	4.40	0.02	6.59	4.66	0.07	NS	1.02
Liver				$\mu\text{g/g}$				
Retinol	20.5	26.2	NS	23.2	23.5	NS	NS	5.20
Retinyl myristate	22.5	25.6	NS	20.0	28.1	0.03	NS	3.61
Retinyl palmitate	247.7	237.3	NS	209.8	275.2	0.001	NS	17.02
Retinyl stearate	220.3	222.7	NS	203.0	240.0	NS	NS	22.78
Alpha-tocopherol	9.29	7.82	NS	11.20	5.92	0.01	NS	1.85
Gamma-tocopherol	1.79	1.87	NS	1.83	1.83	NS	NS	0.49
<i>Pectoralis major</i> muscle				$\mu\text{g/g}$				
Retinol	0.26	0.26	NS	0.26	0.26	NS	NS	0.01
Alpha-tocopherol	7.32	6.85	NS	7.87	6.29	0.001	NS	0.44
Gamma-tocopherol	0.66	0.68	NS	0.69	0.66	NS	NS	0.03

¹Data are expressed in $\mu\text{g/g}$ for tissues or $\mu\text{g/ml}$ for plasma, and given as lsmeans, $n = 32$ per genotype or diet. Not significant, NS.

²Pooled SE of treatment groups.

Table 4 Plasma metabolites and tissue lipid content of 63-d-old chickens in relation to genotype and dietary β -carotene¹

	Genotype (g)		<i>P</i> -value	Diet (d)		<i>P</i> -value	g $\times$ d	SE ²
	AA	GG		Control	β -carotene			
Plasma metabolites				<i>mg/dl</i>				
Calcium	12.6	12.4	NS	12.7	12.3	0.05	NS	0.23
Total cholesterol	153.6	142.1	0.01	150.8	144.9	NS	NS	4.28
HDL-cholesterol	121.5	112.8	0.01	118.1	116.3	NS	0.05	3.33
LDL-cholesterol	23.3	22.1	NS	23.6	21.8	NS	NS	1.64
Lipid content				<i>%</i>				
Liver	4.8	4.5	NS	4.8	4.6	NS	NS	0.25
<i>Pectoralis major</i>	0.92	0.90	NS	0.91	0.91	NS	NS	0.03

¹Data are given as lsmeans, $n = 32$ per genotype or diet. Not significant, NS.

²Pooled SE of treatment groups.

Table 5 Body weight and yields and color traits of 63-d-old chickens in relation to genotype and dietary β -carotene¹

	Genotype (g)		P-value	Diet (d)		P-value	g $\times$ d	SE ²
	AA	GG		Control	β -carotene			
Body weight	1825	1742	0.02	^g 1799	1768	NS	NS	35.67
Yields				[%]				
Abdominal fat	3.06	3.08	NS	3.20	2.93	0.03	NS	0.12
Breast	12.16	12.52	0.01	12.21	12.47	0.06	NS	0.14
Leg	22.83	22.74	NS	22.54	23.04	0.002	NS	0.16
Liver	1.71	1.66	NS	1.70	1.67	NS	NS	0.03
<i>Pectoralis major</i> muscle color traits ³								
L*	47.87	47.80	NS	47.92	47.75	NS	NS	0.38
a*	-0.71	-0.64	NS	-0.67	-0.69	NS	NS	0.11
b*	6.89	7.14	0.03	7.08	6.95	NS	NS	0.12
Plasma color index ⁴	10.30	8.98	0.003	10.32	8.85	0.002	0.004	0.44

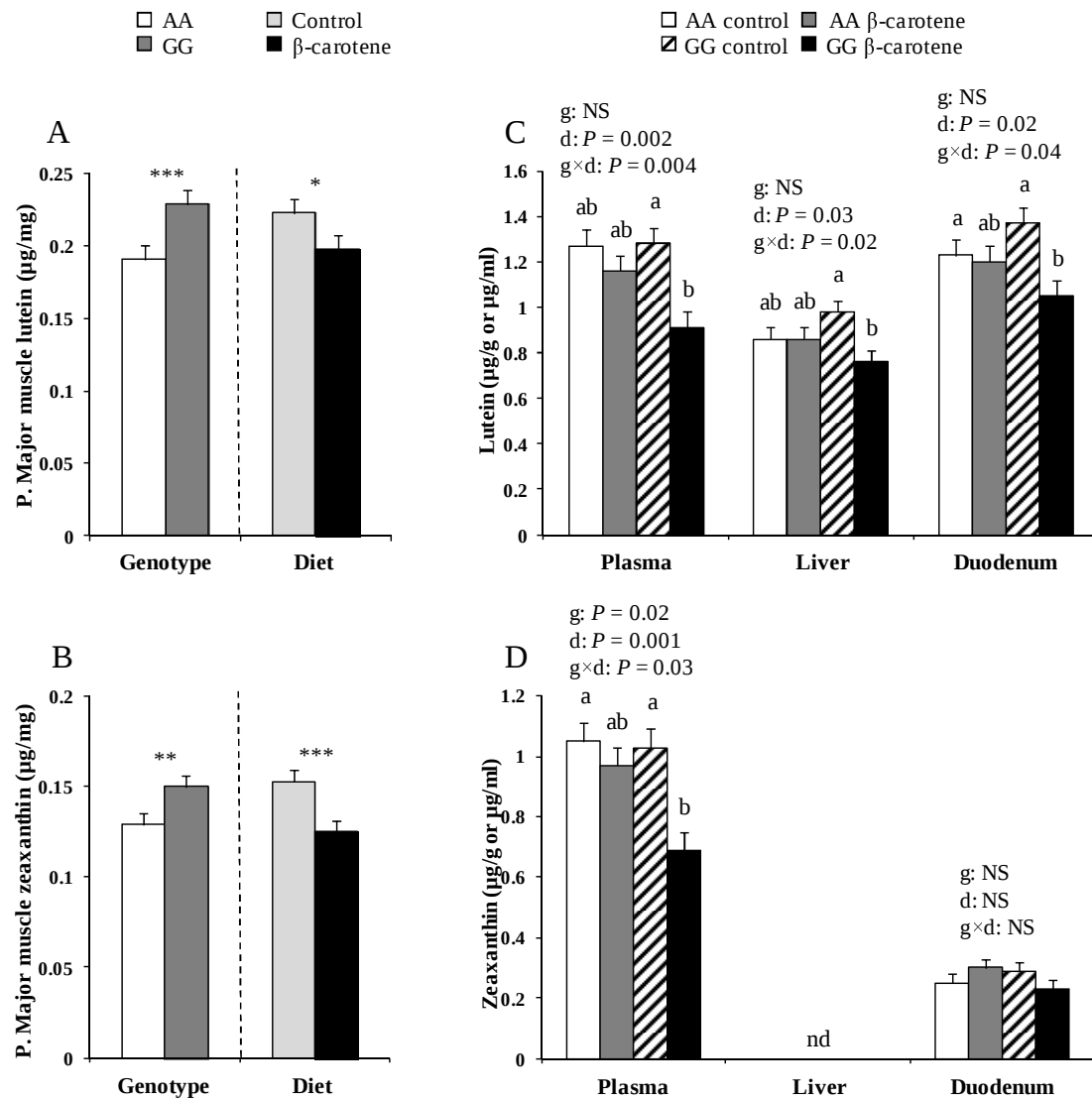
¹Data are given as lsmeans, $n = 92$ -120 per genotype and $n = 105$ -106 per diet. Not significant, NS.

²Pooled SE of treatment groups.

³Lightness, L*; redness, a*; yellowness, b*.

⁴Expressed as arbitrary units.

Figure 1



Online Supporting Material

Supplementary Table 1 Primers used for real-time PCR analysis

Gene	Primer sequences (5'-3')	Accession number	Product size (bp)
18S rRNA	Forward TCCAGCTAGGAATAATGGAATAGGA Reverse CCG GCCGTCCCTCTTAAT	AF173612	83
ACTB	Forward CTGGCACCTAGCACAAATGAA Reverse CTGCTTGCTGATCCACATCT	NM_205518	103
GAPDH	Forward AGGCGAGATGGTGAAAGTCGGAGT Reverse TGCCCTTGAAGTGTCCGTGTGT	NM_204305	176
BCMO1	Forward AACAAAGAAGAGCATCCAGAGCC Reverse GCCAAGCCATCAAACCAGTG	NM_204635	145
BCDO2	Forward GGTTTCTTTCTGAGCCTGACCTTG Reverse CCAGCTAGGAATAATGGAATAGGA	XM_417929	156
SCARB1	Forward ACCTCTTTGAAGTGCAGAACCC Reverse ATGACAACGACACCGTCTCCT	XM_415106	135
CD36	Forward CTGTTTCTCTTTGTGGCCTTTG Reverse CGTGAGAGAAGCTGTATGGAGG	NM_001030731	136

18S ribosomal RNA, 18S; β -Actin, ACTB; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH; β , β -carotene 15,15'-monooxygenase, BCMO1; β , β -carotene 9',10'-dioxygenase, BCDO2; Scavenger receptor class B type 1, SCARB1. cluster determinant 36, CD36.

II.8. Discussion

II.8.1. Impact du polymorphisme

Dans la présente étude, l'aliment formulé limite délibérément l'apport en xanthophylles. La conséquence la plus évidente est la diminution de l'intensité de coloration jaune des filets, quel que soit le génotype ou le régime alimentaire (supplémenté ou non en β -carotène), par rapport aux valeurs rapportées dans la première étude (b^* moyen de 9,2 dans la première étude vs 7,0 dans la seconde étude). En conséquence, la différence de coloration jaune au niveau du filet entre les génotypes AA et GG est plus limitée mais encore significative. Il est aussi à noter que le différentiel d'expression en ARNm de BCMO1 n'est plus que de 2 contre 3 dans la précédente étude entre les génotypes (AA >> GG).

Le changement de régime a aussi eu des conséquences jusqu'alors non observées dans nos précédentes études. Ainsi, le génotype AA est caractérisé par un poids vif à l'abattage supérieur, un rendement en filet légèrement inférieur et une teneur en cholestérol plasmatique total supérieure par rapport au génotype GG. Les poulets AA sont aussi caractérisés par des teneurs plasmatiques en α - et β -tocophérol et duodénale en α -tocophérol supérieures à celle des GG. Un autre effet important du génotype est le différentiel d'expression de BCMO1 observé au niveau duodénal dans le sens inverse de celui observé dans le muscle P. major. Etant donné, qu'il n'existe pas d'interaction significative entre génotype et alimentation (+/- β -carotène) sur ces effets, nous pouvons faire l'hypothèse que la diminution de l'apport en xanthophylles dans la ration explique en partie ces différences d'observation entre études.

Concernant, les différences de vitamine E et de cholestérol entre AA et GG, nous avons formulé l'hypothèse que la diminution de l'apport en caroténoïdes était susceptible de favoriser l'absorption d'autres micronutriments dont la vitamine E ou le cholestérol. Nos résultats indiquent que l'incorporation de ces deux types de métabolites serait particulièrement favorisée chez les AA expliquant ainsi leurs teneurs plus élevées en cholestérol et vitamine E dans le plasma et la plupart des tissus étudiés par rapport aux GG. Même si la raison de ce phénomène reste à élucider, il apparaît que la modulation des phénomènes de compétition entre génotypes puisse en partie expliquer leurs phénotypes.

Concernant l'impact du génotype sur le niveau en ARNm de BCMO1 dans le duodénum, il est cependant difficile d'établir un lien avec les autres variations observées. Une hypothèse pourrait être que certains micronutriments puissent influencer l'activité du gène BCMO1. Ainsi la vitamine E, dont les concentrations dans le plasma et le duodénum diffèrent entre génotypes (AA > GG), est connue pour promouvoir le clivage central du β -carotène par BCMO1 au détriment du clivage asymétrique par BCDO2 (Yeum et al., 2000 ; Liu et al., 2004). Or dans notre étude, les animaux AA présentent des teneurs en vitamine E plus fortes mais une expression plus faible de BCMO1 dans le duodénum par rapport aux animaux GG. On sait aussi que certains xanthophylles (zéaxanthine, canthaxanthine) peuvent inhiber l'activité de BCMO1 (Grolier et al., 1997). Dans notre étude, les teneurs en lutéine ou zéaxanthine du duodénum ne sont pas affectées par le génotype ce qui ne plaide pas en faveur d'un rôle de ces micronutriments dans la régulation de l'expression du gène entre génotypes.

II.8.2. Impact de l'apport en β -carotène

Le β -carotène exerce quant à lui plusieurs effets propres, observés de façon similaire dans les deux génotypes de poulets. En premier lieu et logiquement, l'apport en β -carotène augmente les teneurs en vitamine A stockées dans le foie. Il impacte aussi négativement les teneurs plasmatiques et tissulaires en vitamine E (α -tocophérol en particulier). Il est probable qu'un phénomène de compétition entre β -carotène et les tocophérols soit à l'origine de ces effets. On sait par exemple que la vitamine E diminue l'absorption intestinale de la canthaxanthine chez le rat (Hageman et al., 1999). Dans notre étude, il semble que ce soit plutôt le β -carotène qui limite l'absorption intestinale ou la diffusion de la vitamine E dans le plasma et les tissus.

Le β -carotène réprime par ailleurs l'expression de BCMO1 et SCARB1 dans le duodénum et de BCMO1 dans le foie. Chez les mammifères, plusieurs études ont rapporté un rétrocontrôle négatif de l'expression génique ou de l'activité enzymatique BCMO1 par les caroténoïdes provitamine A (dont le β -carotène), la vitamine A ou ses dérivés (comme l'acide rétinoïque) en particulier au niveau du tractus intestinal (Bachmann et al., 2002; Wyss, 2004 ; Lobo et al., 2010a). Ce rétrocontrôle implique les récepteurs aux rétinoïdes, RAR et RXR (Bachman et al., 2002 ; Takitani et al., 2006). Dans l'intestin, l'acide rétinoïque exerce un effet concomitant sur l'expression de BCMO1 et SCARB1 impliquant l'élément de réponse ISX (Lobo et al.,

2010a ; Lietz et al., 2010). Notre étude indique que chez le poulet également BCMO1 et SCARB1 seraient régulés de façon concomitante en réponse à l'apport de β -carotène.

Notre étude a aussi permis de montrer que l'apport en β -carotène dans la ration alimentaire permet de limiter l'engraissement chez le poulet. Ce résultat est tout à fait cohérent avec de précédentes observations sur mammifères qui ont en particulier montré l'effet négatif du β -carotène sur la capacité de stockage en lipides des adipocytes (Lobo et al., 2010b; Amengual et al., 2011). De façon plus originale, nous montrons aussi que l'apport en β -carotène augmente légèrement les rendements en filet et en cuisse de la carcasse et diminuent la teneur en calcium plasmatique.

II.8.3. Effets interactifs : vers une compréhension des mécanismes

Au-delà de ces effets observés de façon similaire dans les deux génotypes de poulets (AA et GG), nous avons pu mettre en évidence des effets du β -carotène spécifiques à l'un ou l'autre des génotypes. En premier lieu, il apparaît que l'apport en β -carotène induise une augmentation du rétinol dans le duodénum des animaux AA uniquement. Cette observation est cohérente avec nos précédents résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* et qui démontrent que l'activité du gène BCMO1 est supérieure chez le génotype AA par rapport au génotype GG (Le Bihan-Duval et al., 2011 ; Jlali et al., 2012). Il est donc logique qu'en réponse à un apport en β -carotène similaire, la conversion en vitamine A soit plus efficace et que l'augmentation des niveaux en rétinol duodénal soit supérieure chez les AA par rapport aux GG. Par contre, nous observons qu'au niveau duodénal, l'expression de BCMO1, principal acteur de la conversion du β -carotène en vitamine A est inférieure chez les AA par rapport aux GG. Ce résultat surprenant pourrait être expliqué par un phénomène de rétrocontrôle plus efficace chez les AA qui voient leur teneur en rétinol augmenter dans le duodénum alors que ce n'est pas le cas chez les GG.

L'autre interaction significative concerne l'impact négatif du β -carotène sur les concentrations plasmatiques et tissulaires en lutéine et zéaxanthine, qui sont uniquement diminuées chez les animaux GG à part dans le muscle P. major où l'interaction génotype $\times$ nutrition disparaît. La compétition entre lutéine, zéaxanthine et β -carotène a déjà été démontré chez le poulet lorsque ces micronutriments sont présents à forte dose dans les aliments (Wang et al., 2010b).

Notre étude indique que ce phénomène est aussi vrai en cas d'apport réduit de xanthophylles dans la ration. Il a en fait été montré que l'ingestion simultanée de lutéine et de β -carotène peut entraîner une diminution de l'absorption intestinale de la lutéine (Mamatha et Baskaran, 2011).

Les différences de réponse des deux génotypes à un apport en β -carotène conforteraient cette hypothèse. En effet, bien que les teneurs tissulaires ou plasmatiques en β -carotène n'aient pu être quantifiées, l'augmentation de concentration en rétinol observée dans le duodénum de poulets AA suite à l'ingestion de β -carotène suggère que la disponibilité de ce dernier est réduite par rapport aux animaux GG. Ceci pourrait expliquer pourquoi l'effet concurrentiel du β -carotène vis-à-vis des autres micronutriments est faible chez les AA et élevé chez les GG, qui voient leur statut en xanthophylles mais aussi en HDL-cholestérol diminuer en réponse à l'apport de β -carotène.

II.8.4. Conclusion

La présente étude avait pour objectif d'élucider les mécanismes qui régulent les variations de concentrations en xanthophylles entre génotypes. En effet, la lutéine et la zéaxanthine n'étant pas des substrats de BCMO1 il est probable que des phénomènes de régulation plus complexes relient les différentiels d'activité du gène et les phénotypes observés (couleur et teneurs en xanthophylles).

A partir de nos observations nous pouvons faire les hypothèses suivantes : la conversion du β -carotène en vitamine A serait plus efficace au niveau du duodénum des animaux AA par rapport aux GG. La conséquence est une compétition accrue entre β -carotène et xanthophylles chez les GG qui entraîne une diminution des teneurs en lutéine et zéaxanthine mais aussi en HDL-cholestérol plus prononcée chez ces derniers. Par contre, nos résultats ne permettent pas de comprendre par quel mécanisme les teneurs en xanthophylles du muscle P. major diffèrent entre génotypes. En effet, si nous confirmons de façon certaine qu'une baisse d'expression de BCMO1 correspond à une augmentation des niveaux en lutéine et zéaxanthine dans le muscle le mécanisme sous-jacent reste incertain. L'hypothèse d'un rôle direct de l'enzyme BCMO1 dans la conversion de ces xanthophylles reste l'explication la plus logique au regard de nos résultats. Il serait donc intéressant de développer un test enzymologique pour mesurer

l'activité de BCMO1 contre ces substrats qui prendrait en compte la production de métabolites autres que ceux classiquement produits lors de la conversion des caroténoïdes pro-vitamine A (comme le β -carotène) en vitamine A.

Conclusions et perspectives

Dans l'industrie de la volaille, on assiste aujourd'hui à une forte progression de la consommation de produits élaborés (produits de découpes, jambons, charcuterie, etc.) au détriment des volailles consommées en carcasses entières. Ceci pose la question de l'adaptation de la viande à ces nouvelles formes d'utilisation et renforce l'importance de la qualité technologique. Or, les différents travaux menés ces dernières années par l'INRA et l'ITAVI ont clairement montré que la viande produite en France présente des caractéristiques très hétérogènes qui pénalisent les industries de la découpe et de la transformation. Les propriétés de la viande de volaille sont sous la dépendance de nombreux facteurs de variations liés aux caractéristiques intrinsèques des animaux, à leurs conditions de production mais aussi à celles qui entourent l'abattage. Ceci explique certainement les difficultés qu'ont actuellement les industriels pour homogénéiser la qualité de leur production.

Dans ce contexte, l'Unité de Recherches Avicoles (URA) conduit des recherches pour approfondir les mécanismes physiologiques à l'origine des variations de qualité de viande. La connaissance de ces mécanismes doit permettre à terme de proposer des stratégies de production pour améliorer durablement la qualité des produits. Les recherches de l'URA ont en particulier démontré qu'il existe un contrôle génétique important des caractéristiques de qualité de la viande et qu'il est donc possible d'envisager des stratégies de sélection pour adapter les caractéristiques de la viande à son mode de commercialisation. Plusieurs études ont aussi montré qu'il existait un lien fort entre la composition corporelle des animaux (ratio muscle/gras) et les caractéristiques métaboliques du muscle qui déterminent en grande partie la qualité ultérieure de la viande. Ceci a été notamment démontré en comparant des lignées génétiques présentant des caractéristiques de croissance ou de composition corporelle différentes. L'alimentation conditionnant (avec la génétique) en grande partie la composition de la carcasse, il est aussi apparu important de mieux comprendre comment elle pouvait influencer la qualité des viandes, en particulier ses caractéristiques technologiques.

Les travaux de ma thèse s'inscrivent dans cette démarche. L'originalité est de considérer les effets interactifs qui peuvent exister entre la génétique et l'alimentation avec pour (1) objectif scientifique d'approfondir les connaissances sur les mécanismes moléculaires qui régulent les caractéristiques musculaires importantes pour la qualité des viandes et (2) objectif finalisé de mieux adapter les conditions de production en réponse aux attentes des industriels et des consommateurs.

Dans le cadre d'une stratégie commune, impliquant des modèles d'interaction génétique×nutrition, nous nous sommes intéressés à deux types de caractères impliquant des déterminismes indépendants : le pH ultime de la viande qui dépend essentiellement de la teneur en glycogène du muscle au moment de la mort des animaux et l'intensité de coloration qui dépend de la teneur en pigments caroténoïdes.

Notre hypothèse de départ était que l'effet de l'alimentation peut dépendre des caractéristiques génétiques des animaux qui vont conditionner leur physiologie, en particulier leur métabolisme.

Dans notre première étude, nous nous sommes intéressés aux effets de l'apport en protéines (17 vs 23 % de matières azotées totales) de l'aliment sur la teneur en glycogène du muscle et les caractères de qualité qui en dépendent (pH ultime, luminosité, rétention en eau). Les effets de l'alimentation ont été étudiés en considérant deux lignées expérimentales de poulets sélectionnées de façon divergente sur leur engraissement abdominal. Ce modèle génétique a été choisi car une étude précédente (Sibut et al., 2008) a montré que les animaux des deux lignées diffèrent aussi pour la teneur en glycogène de leur muscle, mesurée au moment de l'abattage : les animaux de la lignée grasse présentent des muscles pectoraux plus riches en glycogène que ceux de la lignée maigre. Notre étude a confirmé que dans le cas d'un faible apport en protéine (17 %), le différentiel de glycogène musculaire existe toujours entre les deux lignées. Par contre, quand l'apport est de 23 % (c'est-à-dire supérieur de 3 % à un apport classique de 20 %) les différences de glycogène entre génotypes sont annulées. En effet, le glycogène musculaire des animaux maigres augmente avec l'augmentation de l'apport en protéines du régime alors que celui des animaux gras n'évolue pas. Cette insensibilité des animaux gras suggèrent que les besoins des animaux (qui diffèrent entre les deux lignées) pourraient conditionner leur réponse au niveau du muscle. Une autre observation importante est que dans le cadre de notre modèle le lien positif entre adiposité de la carcasse et teneur en glycogène du muscle, qui avait été observé dans plusieurs études (Berri et al., 2001 ; Le Bihan-Duval et al., 2001 ; Berri et al., 2008 ; Sibut et al., 2001), n'est pas systématique. Ainsi, chez les animaux maigres, augmenter la teneur en protéines de la ration conduit logiquement à diminuer leur engraissement abdominal mais augmente aussi la teneur en glycogène de leur muscle pectoral. Ce résultat suggère qu'il est peut-être nécessaire de raisonner en « dynamique » c'est-à-dire en considérant la capacité des animaux à un instant t à utiliser leur

apport alimentaire à des fins de protéosynthèse (dépôt de muscle) ou de mise en réserve énergétique (dépôt de gras ou de glycogène au niveau du muscle). Les capacités de protéosynthèse ou de mise en réserve énergétique des deux lignées maigre et grasse étant différentes il n'est pas surprenant que l'utilisation qu'elles feront de leur apport alimentaire le soit aussi. Ainsi, les animaux gras seraient en capacité de déposer des réserves énergétiques qu'elles que soient les conditions nutritionnelles étudiées alors que les animaux maigres le seraient qu'en cas d'apport protéique élevé.

Ces résultats indiquent donc qu'il est primordial de prendre en compte les caractéristiques génétiques et plus généralement physiologiques des animaux et qu'il sera indispensable d'établir des lois de réponses à l'alimentation en fonction des caractéristiques des animaux (génétiques, âge, sexe, etc.) si l'on veut à terme développer des stratégies d'alimentation efficaces pour adapter ou améliorer la qualité de la viande chez le poulet.

L'autre résultat important de cette première étude est la confirmation d'un rôle potentiel de l'AMPK dans le contrôle des réserves en glycogène du muscle et de la qualité des viandes chez les poulets. Jusqu'à présent, l'implication de l'AMPK avait été suggérée dans des modèles génétiques présentant des différences de glycogène musculaire et de qualité des viandes (Sibut et al., 2008, 2011). L'originalité de notre étude a été de montrer que l'activité de l'AMPK pouvait être aussi modulée par la voie alimentaire chez le poulet et affecter significativement la qualité de la viande. Plusieurs observations réalisées au laboratoire semblent confirmer ce fait. Ainsi, il a été possible de montrer que la distribution alternée (toutes les 24 h) d'aliments riches en énergie ou en protéines entraînait une modulation des réserves en glycogène du muscle associée à des variations des niveaux de phosphorylation de l'AMPK (activée à l'état phosphorylé) et d'une de ses protéines cibles, la glycogène synthase (inhibée à l'état phosphorylé) (Mameri et al., 2010). Plus récemment, il a aussi été montré que la source de méthionine (la DL-méthionine ou l'hydroxy-analogue HMTBA) peut moduler le pH ultime du filet de poulet affectant son pouvoir de rétention en eau et ses rendements technologiques lors de la transformation en jambon (Mercier et al., 2009). De récentes observations suggèrent par ailleurs que les différences de pH observées entre DL-méthionine et HMTBA seraient liées à des différences de phosphorylation de l'AMPK et de sa cible, la glycogène synthase (Tesseraud et al., 2011).

Il semble donc que l'AMPK joue un rôle de « pivot métabolique » dont l'activité et la sensibilité dépendent du patrimoine génétique des animaux mais aussi de facteurs environnementaux tels que la nutrition. En ce sens, il constitue un biomarqueur intéressant de la qualité de la viande et l'étude de sa régulation devrait à terme permettre de mieux comprendre l'impact des facteurs de production sur la qualité des produits. Comme mentionné précédemment, plusieurs études *in vivo* ont d'ores et déjà mis en évidence plusieurs régulateurs nutritionnels de l'AMPK chez le poulet. Ces études devront être complétées par des études menées *in vitro*, sur cultures primaires ou lignées cellulaires, afin de mieux définir les conditions d'activation ou d'inhibition de l'AMPK par les nutriments (acides aminés par exemple) et les conséquences en termes de synthèse et d'accumulation de glycogène.

Plus globalement, notre étude et les résultats récents obtenus au laboratoire ont suggéré un nouveau concept pour améliorer la qualité des viandes. Il s'agirait d'orienter le métabolisme intermédiaire des animaux *via* l'alimentation pour à terme obtenir les caractéristiques de viande recherchées. Toutefois, les stratégies envisagées ne doivent pas pénaliser les caractéristiques de la carcasse (poids, rendements en muscle, engraissement) et donc doivent se faire sur une durée limitée. Au vue des résultats de Mameri et al. (2010), il semble possible de moduler le glycogène musculaire sur une période très courte (24 h), donc des premiers essais ont été réalisés pour évaluer les possibilités de modification de la qualité des viandes en modifiant l'apport alimentaire sur une période de 3 jours seulement avant l'abattage. Les premiers résultats sont encourageants puisqu'ils montrent qu'en déséquilibrant les apports en lysine (promoteur de synthèse protéique) et en autres acides aminés (+ ou - 10 % par rapport aux besoins en lysine), il est possible de faire varier le pH ultime de la viande sans affecter significativement les caractéristiques technico-économiques des animaux. Les lois de réponse doivent maintenant être affinées en tenant compte des caractéristiques intrinsèques des animaux pour proposer à terme des évolutions pratiques à la filière dans le but d'améliorer la qualité et donc la compétitivité de la production.

Dans le deuxième volet de la thèse, le contexte expérimental était différent puisque nous avons eu la chance de disposer d'un modèle génétique spécifique, c'est-à-dire des animaux présentant un même fond génétique et se différenciant seulement pour un SNP (AA ou GG) au locus du gène BCMO1. Dans une espèce comme le poulet ou la transgénèse ou l'inactivation de gène n'est pas encore facile à maîtriser, la découverte de ce polymorphisme

est d'un grand intérêt pour à terme élucider les mécanismes moléculaires qui régissent le métabolisme des caroténoïdes mais aussi celui des vitamines liposolubles ou du cholestérol, qui interagissent fortement entre eux.

La question majeure de cette partie de la thèse était : comment des variations d'activité du gène BCMO1 peuvent-elles impacter le statut en xanthophylles du muscle P. major ? En effet, selon la littérature, ni la lutéine ni la zéaxanthine ne sont des substrats naturels de l'enzyme BCMO1 ce qui suggère des mécanismes de régulation indirects. Pour cette raison nous avons inclus dans nos études différents tissus dont le principal site d'absorption (le duodénum) et différents sites de stockage (foie et muscles squelettiques).

Le premier enseignement de nos études est que l'effet de la mutation sur les niveaux d'expression du gène BCMO1 et le statut en caroténoïdes est tissu-dépendant. Il est systématiquement fortement observé dans le muscle P. major du filet mais généralement pas observés dans les autres tissus étudiés (y compris le muscle oxydo-glycolytique *Sartorius* de la cuisse). Toutefois, dans le duodénum, il est apparu que la diminution de l'apport en xanthophylles (en remplaçant le maïs par du blé) révèle un effet inverse du polymorphisme sur l'expression de BCMO1 (AA < GG vs AA >> GG dans le muscle P. major). Cette observation nous est apparue surprenante au premier abord. D'autant plus que nous montrons clairement que l'apport en β -carotène (principal substrat de BCMO1) correspond à une augmentation des niveaux en rétinol du duodénum seulement chez les poulets porteurs de l'allèle AA qui selon notre hypothèse de départ présentent une activité de conversion du β -carotène supérieure à celle des GG. Nous avons donc formulé l'hypothèse que la conversion plus efficace du β -carotène en rétinol *via* BCMO1 chez les AA conduirait à un rétrocontrôle négatif de l'expression du gène BCMO1 (largement décrit dans la littérature) plus fort dans ce génotype, expliquant ainsi nos observations dans le duodénum.

Les différences de résultats que nous avons obtenues entre nos deux études (notamment en cas d'absence d'apport en β -carotène) suggèrent que l'apport même en xanthophylles du régime influencerait l'impact de la mutation sur la physiologie de l'animal. Ainsi, si les effets sur les propriétés du muscle P. major sont retrouvés dans le cas des deux régimes, le remplacement du maïs par le blé met en évidence des effets spécifiques du génotype sur la croissance (AA > GG), les teneurs plasmatiques en cholestérol et en vitamine E dans le

duodénum et le plasma (AA > GG pour tous les métabolites). La littérature indique clairement qu'il existe une compétition entre ces différents métabolites qui interviennent au moment de l'absorption par les entérocytes ou plus tard lors de la diffusion vers les tissus cibles. Il est donc possible que le génotype (c'est-à-dire l'activité du gène BCMO1) affecte l'intensité de ces phénomènes de compétition, avec selon nos résultats un effet plus marqué chez les GG que chez les AA en tous les cas quand l'apport en xanthophylles est limité (étude 2). En effet, il semble que les différences entre génotypes n'existent plus quand l'apport en xanthophylles est élevé (étude 1).

La compétition entre nutriments apparaît aussi supérieure chez les GG suite à l'apport en β -carotène qui diminue significativement les teneurs tissulaires et plasmatiques en vitamine E, cholestérol et xanthophylles, les effets étant seulement significatifs chez les GG pour les deux derniers types de métabolites. L'hypothèse que nous avons donc formulée est que les animaux porteurs de l'allèle GG présentent une moins bonne capacité à convertir le β -carotène en vitamine A au niveau duodénal, accentuant les effets de compétition entre nutriments chez ce génotype par rapport aux animaux AA. Ceci pourrait expliquer pourquoi les effets de la mutation sont variables entre tissus et conditions nutritionnelles (apport en xanthophylles ou en β -carotène).

Afin de mieux comprendre les acteurs moléculaires qui pourraient être impliqués dans ces phénomènes, nous avons étudié l'expression génique de deux transporteurs (SR-BI codé par SCARB1 et CD36) et de BCDO2 capable de convertir les xanthophylles en apocaroténoïdes. Nos résultats n'indiquent pas d'effet du génotype sur les niveaux en ARNm de SCARB1, de CD36 et de BCDO2. Il nous manque donc encore des éléments pour statuer définitivement sur les mécanismes moléculaires qui expliquent les différences de phénotypes observées entre les génotypes AA et GG, notamment au niveau du muscle. La possibilité que l'enzyme BCMO1 puisse jouer un rôle direct dans le clivage de la lutéine et la zéaxanthine reste l'hypothèse la plus cohérente compte-tenu de nos observations. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait développer un test enzymologique pour évaluer ce rôle potentiel de BCMO1, en s'intéressant notamment à d'autres métabolites que ceux produits lors de la conversion des caroténoïdes pro-vitamine A qui généralement étaient les seuls recherchés dans les études qui ont statué sur la « non-activité » de BCMO1 vis-à-vis des xanthophylles.

En perspective à ce travail, il sera aussi intéressant d'évaluer les effets du polymorphisme à BCMO1 dans des conditions nutritionnelles limitant tout apport en vitamine A exogène (y compris chez les reproductrices) et faisant uniquement varier l'apport en β -carotène. En effet, dans les modèles que nous avons étudiés jusqu'à ce jour, l'apport en vitamine A était maintenu et le β -carotène éventuellement ajouté à la ration n'était pas nécessaire à la croissance et au bon développement des animaux. En éliminant tout autre apport en vitamine A ou provitamine A que le β -carotène, nous devrions mettre en exergue des différences plus prononcées entre génotypes liées à leur plus ou moins bonne capacité à convertir le β -carotène en vitamine A. Par ailleurs, il a été possible au laboratoire de mettre en culture des cultures primaires de myoblastes issus des génotypes AA et GG qui présentent, comme cela a été observé *in vivo*, un différentiel d'expression en ARNm de BCMO1 (AA >> GG). Ce modèle unique devrait en complément des études *in vivo* permettre de mieux comprendre les effets d'interaction avec les nutriments, (caroténoïdes, vitamines, etc.) mais aussi d'évaluer les conséquences du polymorphisme sur les phénomènes de prolifération et de différenciation qui interviennent au cours de la myogenèse et peuvent influencer la croissance et les propriétés métaboliques du muscle sur un plus long terme. Au-delà de l'exploration des mécanismes et des facteurs de régulation, il sera aussi important d'évaluer plus précisément les conséquences du polymorphisme sur l'activité de l'enzyme BCMO1 ainsi que les propriétés du muscle et de la viande. En effet, les caroténoïdes et la vitamine E présentent des capacités anti-oxydantes reconnues qu'il sera important d'évaluer dans la viande. Par ailleurs, la consommation en lutéine et zéaxanthine est recommandée dans le cadre de la lutte contre la Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age (DMLA) et il serait intéressant d'évaluer, en partenariat avec des technologues, l'intérêt d'utiliser de la viande de poulet enrichie en ces deux pigments dans la fabrication « d'alicaments ».

Pour conclure, je dirais que les travaux de ma thèse ont contribué à démontrer l'intérêt de l'alimentation pour améliorer la qualité de la viande chez les volailles. Ils soulignent toutefois l'importance de considérer les caractéristiques intrinsèques des animaux, notamment leur génotype, qui va orienter leurs réponses métaboliques et les conséquences sur la qualité de la viande. Cette étude a par ailleurs permis de démontrer la régulation nutritionnelle de plusieurs acteurs moléculaires, notamment l'AMPK qui semble avoir un rôle pivot au niveau du métabolisme énergétique du muscle et BCMO1 dont l'activité pourrait influencer un grand nombre de micronutriments liposolubles chez le poulet.

Références bibliographiques

- Abbot, M. J., Edelman, A. M., & Turcotte, L. P.** CaMKK is an upstream signal of AMP-activated protein kinase in regulation of substrate metabolism in contracting skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2009, 297, R1724-R1732.
- Abdullah, A. Y., & Matarneh, S. K.** Broiler performance and the effects of carcass weight, broiler sex, and postchill carcass aging duration on breast fillet quality characteristics. *J Appl Poult Res*, 2010, 19, 46-58.
- Abeni, F. & Bergoglio, G.** Characterization of different strains of broiler chicken by carcass measurements, chemical and physical parameters and NIRS on breast muscle. *Meat Sci*, 2001, 57, 133-137.
- Adamo, K. B., & Graham, T. E.** Comparison of traditional measurements with macroglycogen and proglycogen analysis of muscle glycogen. *J Appl Physiol*, 1998, 84 (3), 908-913.
- Addis, P. B.** 1986. Poultry muscle as food. Pages 371-404 in: *Muscle as food*. Bechtel, P. J., ed. New York, USA.
- Ai, H., Ihlemann, J., Hellsten, Y., Lauritzen, H. P., Hardie, D. G., Galbo, H., & Ploug, T.** Effect of fiber type and nutritional state on AICAR- and contraction-stimulated glucose transport in rat muscle. *Am J Physiol*, 2002, 282, E1291-E1300.
- Akiba, Y., Sato, K., Takahashi, Matsushita, K., Komiyama, H., Tsunekawa, H., & Nagao, H.** Meat color modification in broiler chickens by feeding yeast *Phaffia rhodozyma* containing high concentrations of astaxanthin. *J Appl Poult Res*, 2001, 10, 154-161.
- Alleman, F., Michel, J., CHagneau, A. M., & Leclercq, B.** Comparative responses of genetically lean and fat broiler chicken to dietary threonine concentration. *Br Poult Sci*, 1999, 40, 485-490.
- Allen, P. C.** Effect of *Eimeria acervulina* infection on chick (*Gallus domesticus*) high density lipoprotein composition. *Comp Biochem Physiol B*, 1987, 87, 313-319.
- Alon, L. T., Pietrokovski, S., Barkan, S., Avrahami, L., Kaidanovich-Beilin, O., Woodgett, J. R., Barnea, A., & Eldar-Finkelman, H.** Selective loss of glycogen synthase kinase-3 α in birds reveals distinct roles for GSK-3 isoenzymes in tau phosphorylation. *FEBS Lett*, 2011, doi:10.1016/j.febslet.2011.03.025.
- Alric, S., Froeschlé, A., Piquemal, D., Carnac, G., & Bonniieu, A.** Functional specificity of the two retinoic acid receptor RAR and RXR families in myogenesis. *Oncogene*, 1998, 16, 273-82.
- Alvarado, C., & McKee, S.** Marination to improve functional properties and safety of poultry meat. *J Appl Poult Res*, 2007, 16, 113-120.
- Alvarenga, R. R., Zangeronimo, M. G., Pereira, L. J., Rodrigues, P. B., & Gomide, E. M.** Lipoprotein metabolism in poultry. *World's Poult Sci J*, 2011, 67 (3), 431-440.
- Amengual, J., Gouranton, E., van Helden, Y. G., Hessel, S., Ribot, J., Kramer, E., Kiec-Wilk, B., Razny, U., Lietz, G., Wyss, A., Dembinska-Kiec, A., Palou, A., Keijer, J., Landrier, J. F., Bonet, M. L., & von Lintig J.** Beta-carotene reduces body adiposity of mice via BCMO1. *Plos One*, 2011, 6:e20644.
- An, J. Y., Zheng, J. X., Li, J. Y., Zeng, D., Qu, L. J., Xu, G. Y., & Yang, N.** Effect of myofiber characteristics and thickness of perimysium and endomysium on meat tenderness of chickens. *Poult Sci*, 2010, 89, 1750-1754.

- Aschenbach, W. G., Hirshman, M. F., Fujii, N., Sakamoto, K., Howlett, K. F., & Goodyear, L. J.** Effect of AICAR treatment on glycogen metabolism in skeletal muscle. *Diabetes*, 2002, 51, 567-573.
- Ashmore, C. R., and Doerr, L.** Comparative aspects of muscle fiber types in different species. *Exp Neurol*, 1971, 31, 408-18.
- Attie, A.D., Hamon, Y., Brooks-Wilson, A R., Gray-Keller, M P., & al.** Identification and functional analysis of a naturally occurring E89K mutation in the ABCA1 gene of the WHAM chicken. *J Lipid Res*, 2002, 43, 1610-1617.
- Azpiazu, I., Manchester, J., Skurat, A. V., Roach, P. J., & Lawrence, J. C.** Control of glycogen synthesis is shared between glucose transport and glycogen synthase in skeletal muscle fibers. *Am J Physiol*, 2000, 278, E234-E243.
- Bachmann, H., Desbarats, A., Pattison, P., & al.** Feedback regulation of beta, beta-carotene 15, 15'-monooxygenase by retinoic acid in rats and chickens. *J Nutr*, 2002, 132, 3616-3622.
- Bacou, F., & Vigneron, P.** Evolution périnatale des voies métaboliques glycolytiques et oxydatives de divers types de muscles squelettiques du lapin et du poulet, *Ann Biol Anim Biochi Biophys*, 1976, 16, 675-686.
- Baéza, E., Arnould, C., Jlali, M., Chartrin, P., Gigaud, V., Mercierand, F., Durand, C., Méreau, K., Le Bihan-Duval, E., Berri, C.** Influence of increasing slaughter age of chickens on meat quality, welfare and technical and economic results. *J Anim Sci*, 2012.
- Baéza, E., Chartrin, P., Le Bihan-Duval, E., Lessire, M., Besnard, J., Berri, C.** Does the chicken genotype 'Géline de Touraine' have specific carcass and meat characteristics? *Animal*. 2009, 3, 764-71.
- Baker, D. M., & Santer, R. M.** Development of a quantitative histochemical method for determination of succinate-dehydrogenase activity in autonomic neurons and its application to the study of aging in the autonomic nervous-system. *J Histochem Cytochem*, 1990, 38, 525-531.
- Balmer, J. E., & Blomhoff, R.** Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res*, 2002, 43, 1773-1808.
- Barbut, S.** Problem of pale soft exudative meat in broiler chickens. *Br Poult Sci*, 1997, 38, 355-358.
- Barbut, S., & Mittal, G. S.** Effects of pH on physical properties of white and dark turkey meat. *Poult Sci*, 1993, 72, 1557-1565.
- Barbut, S., Zhang, L., & Marccone, M.** Effects of pale, normal, and dark chicken breast meat on microstructure, extractable proteins, and cooking of marinated fillets. 2005, *Poult Sci*, 84, 797-802.
- Barnard, E. A., Lyles, J. M., & Pizzey, J. A.** Fibre types in chicken skeletal muscles and their changes in muscular dystrophy. *J Physiol*, 1982, 331, 333-354.
- Barnes, B. R., Marklund, S., Steiler, T. L., Walter, & al.** The 5'-AMP-activated protein kinase gamma 3 isoform has a key rôle in carbohydrate and lipid metabolism i glycolytic skeletal muscle. *J Biol Chem*. 2004, 279, 348-417.
- Barry, J. S., Davidsen, M. L., Limesand, S. W., Galan, H. L., Friedman, J. E., Regnault, T. R. H., & Hay, W. Jr.** Developmental changes in ovine myocardial glucose

- transporters and insulin signalling following hyperthermia- induced intrauterine fetal growth restriction. *Exp Biology Med*, 2006, 231, 566-575.
- Baskaran, S., Roach, P. J., Depaoli-Roach, A. A., & Hurley, T. D.** Structural basis for glucose-6-phosphate activation of glycogen synthase. *PNAS*, 2010, 107 (41), 17563-17568.
- Bassel-Duby, R., & Olson, N.** Signaling pathways in skeletal muscle remodelling. *Annu Rev Biochem*, 2006, 75:19-37.
- Bendall, J. R.** Post mortem changes in muscle. In: Bourne, G. H, *The structure and function of muscle*. New York: Academic Press, 1973, p243-309.
- Bendich, A., & Olson, J. A.** Biological actions of carotenoids. *FASEB J*, 1989, 3, 1927-1932.
- Benjamin, W. B., Pentyla, S. N., Woodgett, J. R., Hod, Y., & Marshak, D.** ATP citrate-lyase and glycogen synthase kinase-3 beta in 3T3-L1 cells during differentiation into adipocytes. *Biochem J*, 1994, 300, 477-82.
- Bensadoun, A., & Rothfeld, A.** The form of absorption of lipids in the chicken, *Gallus domesticus*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1972, 41, 814-817.
- Bergeron, R., Russel, R. R., Young, L. H., Ren, J. M., Marcucci, M., Lee, A., & Shulman, G. I.** Effect of AMPK activation on muscle glucose metabolism in conscious rats. *Am J Physiol*, 1999, 276: 938–944.
- Beri, R.K., Marley, A.E., See, C.G., Sopwith, W.F., Aguan, K., Carling, D., Scott, J., & Carey, F.** Molecular cloning, expression and chromosomal localisation of human AMP-activated protein kinase. *FEBS*, 1994, 356, 117-21.
- Bernstein, P. S., delori, F. C., Richer, S., van Kuijk, F. J. M., Wenzel, A. J.** The value of measurement of macular carotenoid pigment optical densities and distributions in age-related macular degeneration and other retinal disorders. *Vision Research*, 2010, 50, 716-728.
- Berri, C.** Etude de la gélification thermique de la myosine : incidence du polymorphisme musculaire. Thèse de doctorat, Université Blaise Pascal, 1995, 170p.
- Berri, C.** Variability of sensory and processing qualities of poultry meat. *World's Poult Sci J*, 2000, 56, 209-224.
- Berri, C., & Duclos, M. J.** Typologie et ontogenèse des fibres musculaires chez les oiseaux. *INRA Prod Anim*, 2003, 16 (2), 137-143.
- Berri, C., Besnard, J., & Relandeau, C.** Increasing dietary lysine increases final pH and decreases drip loss of broiler breast meat. *Poult Sci*, 2008, 87, 480-4.
- Berri, C., Debut, M., Santé-Lhoutellier, V., Arnould, C., Boutten, B., & al.** Variations in chicken breast meat quality: implications of struggle and muscle glycogen content at death. *Br Poult Sci*, 2005, 46, 572-579.
- Berri, C., Le Bihan-Duval, E., Debut, M., Santé-Lhoutellier, V., Baéza, E., Brunel, V., Jego, Y., & Duclos, M.** Consequence of muscle hypertrophy on Pectoralis major characteristics and breast meat quality of broiler chickens. *J Anim Sci*, 2007, 85, 2005-2011.
- Berri, C., Le Bihan-Duval, E., Gigaud, V., Baeza, E., & Duclos, M. J.** Towards the identification of mechanisms underlying the variation of chicken meat processing ability. XIIIth European Poultry Conference, Tours, France, 23-27 August 2010.

- Berri, C., Le Bihan-Duval, E., Lepetit, J., Baéza, E., Bordeau, T., Peyrin, F., Gigaud, V.** Effet du délai entre abattage et découpe sur la texture des filets de poulets labels, certifiés et standards. Septième Journées de la Recherche Avicole, 28 et 29 mars, 2007, Tours.
- Berri, C., Wacrenier, N. Millet, N., & Le Bihan-Duval, E.** Effects of selection for improved body composition on muscle and meat characteristics of broilers from experimental and commercial lines. *Poult Sci*, 2001, 80, 833-838.
- Berry, S. D., Davis, S. R., Beattie, E. M., Thomas, & al.** Mutation in bovine beta-carotene oxygenase 2 affects milk color. *Genetics*. 2009, 182, 923-926.
- Bertram, H. C., Purslow, P. P., & Andersen, H. J.** Relationship between meat structure, water mobility and distribution: A low field nuclear magnetic resonance study. *J Agric Food Chem*, 2002, 50 (4), 824-829.
- Bhosale, P., & Bernstein, P. S.** Vertebrate and invertebrate carotenoid-binding proteins. *Arch Biochem Biophys*, 2007, 458, 121-127.
- Bilgili, S. F., Egbert, W. R., & Huffman, D. L.** Effect of post-mortem aging temperature on sarcomere length and tenderness of broiler *Pectoralis major*. *Poult Sci*, 1989, 68, 1588-1591.
- Blanchard, P. J. & Mantle, D.** Comparison of proteolytic enzyme levels in chicken, pig, lamb and rabbit muscle at point of slaughter: role in meat tenderisation post mortem. *J Sci Food Agric*, 1996, 71, 83-91.
- Bond, J. J., & Warner, R. D.** Ion distribution and protein proteolysis affect water holding capacity of longissimus thoracis et lumborum in meat of lamb subjected to antemortem exercise. *Meat Sci*, 2007, 75, 406-414.
- Bonneau, M., Touraille, C., Pardon, P., Lebas, F., Fauconneau, B., & Remignon, H.** Amélioration de la qualité des carcasses et des viandes. *INRA Prod Anim*, 1996, 95-110.
- Borel, P.** Genetic variations involved in interindividual variability in carotenoid status. *Mol Nutr Food Res*, 2011, 55:1-13.
- Borel, P., De Edelenyi, F. S., Vincent-Baudry, S., Malezet-Desmoulin, C., & al.** Genetic variants in BCMO1 and CD36 are associated with plasma lutein concentrations and macular pigment optical density in humans. *Ann Med*, 2011, 43 (1), 47-59.
- Borel, P., Drai, J., Faure, H., Fayol, V., Galabert, C., Laromiguière, M., & Le Moël, G.** Données récentes sur l'absorption et le catabolisme des caroténoïdes. *Ann Biol Clin*, 2005, 63 (2), 165-177.
- Borel, P., Moussa, M., Reboul, E., Lyan, B., Deffort, C., Vincent-Baudry, S., Maillot, M., Gastaldi, M., Darmon, M., Portugal, H., Lairon, D., Planells, R.** Human fasting plasma concentrations of vitamin E and carotenoids, and their association with genetic variants in apo C-III, cholesteryl ester transfer protein, hepatic lipase, intestinal fatty acid binding protein and microsomal triacylglycerol transfer protein. *Br J Nutr*, 2009, 101, 680-7.
- Borel, P., Moussa, M., Reboul, E., Lyan, B., Deffort, C., Vincent-Baudry, S., Maillot, M., Gastaldi, M., Darmon, M., Portugal, H., Planells, R., Lairon, D.** Human plasma levels of vitamin E and carotenoids are associated with genetic polymorphisms in genes involved in lipid metabolism. *J Nutr*, 2007, 137, 2653-9.

- Bottinelli, R., & Reggiani, C.** Human skeletal muscle fibres: molecular functional diversity. *Prog Biophys Mol Biol*, 2000, 73, 195-262.
- Boulanger, A., Mclemore, P., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Yu, S. S., Gentleman, S., & Redmond, M.** Identification of beta-carotene 15,15'-monooxygenase as a peroxisome proliferators activated receptor target gene. *FASEB J*, 2003, 17, 1304-1306.
- Bourneuf, E., Hérault, F., Chicault, C., Carré, W., Assaf, S., Monnier, A., Mottier, S., Lagarrigue, S, Douaire, M., Mosser, J., & Diot, C.** Microarray analysis of differential gene expression in the liver of lean and fat chickens. *Gene*, 2006, 372, 162-70.
- Bouskila, M., Hirshman, M., Jensen, J., & Sakamoto, K.** Insulin promotes glycogen synthesis in the absence of GSK3 phosphorylation in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, 294, E28-E35.
- Bowker, B. C., Grant, A. L., Forrest, J. C., & Gerrard, D. E.** Muscle metabolism and PSE pork. *J Anim Sci*, 2000, 79, 1-8.
- Britton, G.** Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J*, 1995, 9, 1551-1558.
- Brooke, M. H., & Kaiser, K. K.** Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch Neurol*, 1970, 23, 369-379.
- Bryant, J. D., McCord, J. D., Unlu, L. K., & Erdman, J. W.** Isolation and partial characterization of alpha-carotene-containing and beta-carotene containing carotenoprotein from carrot (*Daucus-carota* L) root chromoplasts. *J Agr Food Chem*, 1992, 40, 545-549.
- Buchbinder, J. L., Rath, V. L., & Fletterick, R. J.** Structural relationships among regulated and unregulated phosphorylases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2001, 30, 191-209.
- Cai, G-Z., Callaci, T. P., Luther, M. A., Lee, J. C.** Regulation of rabbit muscle phosphofructokinase by phosphorylation. *Bioph chem*, 1997, 64, 199-209.
- Castañeda, M. P., Hirschler, E. M. & A. R. Sams, A. R.** Skin pigmentation evaluation in broilers fed natural and synthetic pigments. *Poult Sci*, 2005, 84, 143-147.
- Castenmiller, J. J., & West, C.** Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Ann Rev Nutr*, 1998, 18:19-38.
- Chabault, M., Gigaud, V., Baéza, E., Chartrin, P., Chapuis, H., Boulay, M., Arnould, C., Berri, C., & Le Bihan-Duval, E.** Analysis of an alternative slow-growing chicken line reveals a large genetic variability of carcass and meat quality related traits. XIIIth European Poultry Conference, Tours, France, 23-27 August 2010.
- Chambers, J. R., Fortin, A., Mackie, D. A. & Larmond, E.** Comparison of sensory properties of meat from broilers of modern stocks and experimental strains differing in growth and fatness. *Canadian Inst Food Sci Technol J*, 1989, 22, 353-358.
- Chen, X. D., Ma, Q. G., Tang, M. Y., & Ji, C.** Development of breast muscle and meat quality in Arbor Acres broilers, Jingxing 100 crossbred chickens and Beijing fatty chickens. *Meat Sci*, 2007, 220-227.
- Cheung, P C., Salt, I P., Davies, S P, Hardie, D G., & Carling, D.** Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem J*, 2000, 3, 659-669.

- Choe, J. H., Choi, Y. M., Lee, S. H., Shin, H.G., Ryu, Y.C, Hong, G. C., & Kim, B. C.** The relation between glycogen, lactate content and muscle fiber type composition, and their influence on postmortem glycolytic rate and pork quality. *Meat Sci*, 2008, 80 (2), 355-362.
- Choi, M. Y., Romer, A. I., Hu, M., Lepourcelet, M., Mechoor, A., Yesilaltay, A., Krieger, M., Gray, P. A., & Shivdasani, R.A.** A dynamic expression survey identifies transcription factors relevant in mouse digestive tract development. *Development*, 2006, 133, 4119-4129.
- Choi, Y. M., & Kim, B. C.** Muscle fiber characteristics, myofibrillar protein isoforms, and meat quality. *Livestock Science*, 2009, 122, 105-118.
- Choi, Y. M., Lee, S. H., Choe, J. H., Rhee, M. S., Lee, S. K., Joo, S. T., & Kim, B. C.** Protein solubility is related to myosin isoforms, muscle fiber types, meat quality traits, and post-mortem protein changes in porcine *longissimus dorsi* muscle. *Livestock Sci*, 2010, 127, 183-191.
- Christensen, M., Ertbjerg, P., Failla, S., Sañudo, C., Richardson, R. I., & al.** Relationship between collagen characteristics, lipid content and raw and cooked texture of meat from young bulls of fifteen European breeds. *Meat Sci*, 2011, 87, 61-65.
- Chung, H. Y., Ferreira, A. L., Epstein, S., Paiva, S. A. & al.** Site-specific concentrations of carotenoids in adipose tissue: relations with dietary and serum carotenoid concentrations in healthy adults. *Am J Clin Nutr*, 2009, 90, 533-539.
- Coburn, C. T., Knapp, F. F., Jr., Febbraio, M., Beets, A. L. & al.** Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. *J Biol Chem*, 2000, 275, 32523-32529.
- Cohen, P., Alessi, D. R., & Cross, D.** PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction? *FEBS Lett*, 1997, 410, 3-10.
- Copenhafer, T. L., Richert, B. T., Schinckel, A. P., Grant, A. L., & Gerrard, D. E.** Augmented postmortem glycolysis does not occur early postmortem in AMPK γ 3-mutated porcine muscle of halothane positive pigs. *Meat Sci*, 2006, 73, 590-599.
- Cross, B. A. E., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M., & Hemmings, B. A.** Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, 1995, 378, 785-789, 1995.
- Culioli, J., Berri, C., & Mouro, J.** Muscle foods: consumption, composition and quality. *Sciences des aliments*, 2003, 23, 13-34.
- Culioli, J., Touraille, C., Bordes, P., Girard, J. P.** Caractéristiques des carcasses et de la viande du poulet "Label fermier". *Arch Geflugelk*, 1990, 53, 237-245.
- Dairou, J., Pluvinage, B., Noiran, J., Petit, E., Vinh, J., Haddad, I., Mary, J., Dupret, J.M., & Rodrigues-Lima, F.** Nitration of a critical tyrosine residue in the allosteric inhibitor site of muscle glycogen phosphorylase impairs its catalytic activity. *J Mol Biol*, 2007, 372, 1009-1021.
- Daly, B. L., Richards, I., Gibson, P. G., Gardner, G. E., & Thompson, J. M., 2002.** Rate of pH decline in bovine muscle post-mortem- A benchmarking study. In proceedings of the 48th international congress of meat science and technology.
- Dean, M., Hamon, Y., & Chimini, G.** The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res*, 2001, 42, 1007-1017.

- Debut, M., Berri, C., Arnould, C., Guemené, D., Santé-Lhoutellier, V., Baéza, E., Jehl, N., Jégo, Y., Beaumont, C., & Le Bihan-Duval, E.** Behavioural and physiological responses of three chicken breeds to pre-slaughter shackling and acute heat stress. *Br Poult Sci*, 2005, 46, 527-535.
- Debut, M., Berri, C., Baéza, E., Sellier, N., Arnould, C., Guémené, D., Bouten, B., Jehl, N., Jégo, Y., Beaumont, C., & Le Bihan-Duval, E.** Variation of chicken technological meat quality in relation with genotype and stressing pre-slaughter conditions. *Poult Sci*, 2003, 82, 1829-1838.
- Deming, D. M., Boileau, A. C., Lee, C. M., Erdman, & J. W. Jr.** Amount of dietary fat and type of soluble fiber independently modulate postabsorptive conversion of β -carotene to vitamin A in Mongolian gerbils. *J Nutr*, 2000, 130, 2789-2796.
- Derave, W., Hua, A. I., Ihleman, J., Witters, L. A., Kristiansen, S., Richter, E. A., & Ploug, T.** Dissociation of AMP-activated protein kinase activation and glucose transport in contracting slow-twitch muscle. *Diabetes*, 2000, 49, 1281-1287.
- Du, M., Shen, Q. W., & Zhu, M.** Role of β -adrenoceptor signaling and AMP-Activated protein kinase in glycolysis of postmortem skeletal muscle. *J Agri Food Chem*, 2005, 53, 3235-3239.
- Duggan, A. E., Marie, R. S. Jr., & Callard, I. P.** Expression of SR-BI (scavenger receptor class B type I) in turtle (*Chrysemys picta*) tissues and other nonmammalian vertebrates. *J Exp Zool*, 2002, 292, 430-434.
- Dunn, A. A., Kilpatrick, D. J., & Gault, N. F. S.** Influence of ultimate pH, sarcomere length and cooking loss on the textural variability of cooked *M. pectoralis major* from free range and standard broilers. *Br Poultry Sci*, 1993, 34, 663-675.
- During, A., & Harrison, E. H.** Mechanisms of provitamin A (carotenoid) and vitamin A (retinol) transport into and out of intestinal Caco-2 cells. *J Lipid Res*, 2007, 48:2283-94.
- During, A., Dawson, H. D., Harrison, E. H.** Carotenoid transport is decreased and expression of the lipid transporters SR-BI, NPC1L1, and ABCA1 is downregulated in Caco-2 cells treated with ezetimibe. *J Nutr*, 2005, 135, 2305-12.
- During, A., Doraiswamy, S., & Harrison, E. H.** Xanthophylls are preferentially taken up compared with beta-carotene by retinal cells via a SRBI-dependent mechanism. *J Lipid Res*, 2008, 49, 1715-1724.
- Dzamko, N L., & Steinberg, G R.** AMPK-dependent hormonal regulation of whole-body energy metabolism. *Acta Physiol*, 2009, 196(1), 115-127.
- El Rammouz, R., Babilé, R., & Fernandez, X.** Effect of ultimate pH on the physicochemical and biochemical characteristics of turkey breast muscle showing normal rate of postmortem pH fall. *Poult Sci*, 2004a, 83, 1750-1757.
- El Rammouz, R., Berri, C., Le Bihan-Duval, E., Babilé, R., & Fernandez, X.** Breed differences in the biochemical determinism of ultimate pH in breast muscles of broiler chickens-A key role of AMP deaminase? *Poult Sci*, 2004b, 83, 1445-1451.
- Embi, N., Rylatt, D B., & Cohen, P.** Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem*, 1980, 107, 519-527.

- Ennion, S., Sant'Ana Pereira, J., Sargeant, A. J., Young, A., & Goldspink, G.** Characterization of human skeletal muscle fibers according to the myosin heavy chain they express. *J Muscle Res Cell Motil*, 1995, 16, 35-43.
- Eriksson, J., Larson, G., Gunnarsson, U., Bed'hom, B., & al.** Identification of the yellow skin gene reveals a hybrid origin of the domestic chicken. *Plos Genet.* 2008, 4 (2): doi: 10.1371/journal.pgen.1000010.
- Estrade, M., Ayoub, S., Talmant, A., & Monin, G.** Enzyme activities of glycogen metabolism and mitochondrial characteristics in muscles of RN-carrier pigs (*Sus scrofa domestica*). *Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol*, 1994, 108, 295-301.
- Fang, X., Yu, S. X., Lu, Y., Bast, R. C. Jr., Woodgett, J. R., & Mills, G. B.** Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *PNAS*, 2000, 97, 11960-11965.
- Farmer, L. J., Perry, G. C., Lewis, P. D., Nute, G. R., Piggott, J. R., & Patterson, R. S.** Responses of Two Genotypes of Chicken to the Diets and Stocking Densities of Conventional UK and Label Rouge Production Systems- II. Sensory Attributes. *Meat Sci*, 1997, 47, 77-93.
- Favier, J. C., Ireland-Rippert, J., Toque, C., & Feinberg, M.** Répertoire général des aliments-Table de composition, 2ème édition, Ed TEC & DOC-INRA, Paris, France, 1995.
- Fernandez, X., Santé, V., Baéza, E., LeBihan-Duval, E., Berri, C., Remignon, H., Babilé, R., Le Pottier, G., & Astruc, T.** Effects of the Rate of Muscle Post mortem pH Fall on the Technological Quality of Turkey Meat. *Br Poultry Sci*, 2002, 43, 245-252.
- Fernandez, X., Sante, V., Baéza, E., Lebihan-Duval, E., Berri, C., Remignon, H., Babile, R., Le Pottier, G., N., M., Berge, P. & Astruc, T.** Post mortem muscle metabolism and meat quality in three genetic types of turkey. *Br Poult Sci*, 2001, 42, 462-469.
- Ferrer, J C., Favre, C., Gomis, R R., Fernandez-Novella, J M., Garcia-Rocha, M., de la Iglesia, N., Cid, E., & Guinovart, J J.** Control of glycogen deposition. *FEBS Lett*, 2003, 546: 127-132.
- Ferrucci, L., Perry, J. R. B., Matteini, A., Perola, M., Tanaka, T., & Silander, K.** Common variation in the β -carotene 15,15'-monooxygenase 1 gene affects circulating levels of carotenoids: A genome-wide association study, *Am J Human Genet.* 2009, 84:123-133.
- Fletcher, D. L.** Broiler breast meat color variation, pH, and texture. *Poult Sci*, 1999, 78, 1323-1327.
- Fletcher, D. L.** Poultry meat quality. *World's Poult Sci J*, 2002, 58, 131-145.
- Fletcher, D. L., Qiao, M., & Smith, D. P.** The relationship of raw broiler breast meat and pH to cooked meat color and pH. *Poult Sci*, 2000, 79, 784-788.
- Fogarty, S., Hawley, S. A., Green, K. A., Saner, N., Mustard, K. J., & Hardie, D. G.** Calmodulin-dependent protein kinase kinase- β activates AMPK without forming a stable complex: synergetic effects of Ca^{2+} and AMP. *Biochem J*, 2010, 426, 109-118.
- France AgriMer.** Les produits carnés, avicoles et laitiers. Données statistiques, 2010.

- Fujii, N., Hayashi, T., Hirshman, M. F., Smith, J. T., Habinowski, S. A., & al.** Exercice induces isoforms-specific increase in 5'AMP-activated protein kinase activity in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res commun*, 2000, 273, 1150-1155.
- Fujii, N., Hirshman, M. F., Kane, E. M., Ho, R. C., Peter, L. E., Seifert, N. M., & Goodyear, L. J.** AMP-activated protein kinase α_2 activity is not essential for contraction and hyperosmolarity induced glucose transport in skeletal muscle. *J Biol Chem*, 2005, 280, 39033-39041.
- Furr, H. C., & Clark, R. M.** Intestinal absorption and tissue distribution of carotenoids. *J Nutr Biochem Review*, 1997, 8, 364-377.
- Geay, Y., Bauchart, D., Hocquette, J-F., & Culioli, J.** Valeur diététique et qualités sensorielles des viandes de ruminants. Incidence de l'alimentation des animaux. *INRA Prod Anim*, 2002, 15 (1), 37-52.
- Geraert, P. A., MacLeod, M. G., Larbier, M., Leclercq, B.** Nitrogen metabolism in genetically fat and lean chickens. *Poult Sci*, 1990, 69, 1911-21.
- Gigaud, V., Berri, C., Le Bihan-Duval, C.** 2007. Influence des facteurs de production sur le potentiel glycolytique musculaire : impact sur la qualité des viandes de volaille ; Étude Office de l'élevage. Projet 2006-2007, 45 pages ; ITAVI/INRA, Nouzilly (FRA).
- Gigaud, V.; Bordeau, T.; Chartrin, P.; Baéza, E.; Berri, C.;** 2011. Technological variability of chicken breast meat quality encountered in France according to the production system. 20th European Symposium on the Quality of Poultry Meat ; Leipzig (DEU) ; 2011/09/04-08, 9 p. ; WPSA.
- Gigaud, V., Le Bihan-Duval, E., & Berri, C.** Facteurs de variation de l'aptitude à la transformation de la viande de volaille. Huitième Journées de la Recherche Avicole, St Malo, 25 et 26 mars 2009.
- Goldfarb, A. H., Bruno, J. F., & Buckenmeyer, P. J.** Intensity and duration of exercise effects on skeletal muscle cAMP, phosphorylase, and glycogen. *J Appl Physiol*, 1989, 66, 190-194.
- Gomis, R. R., Ferrer, J. C., & Guinovart, J. J.** Shared control of hepatic glycogen synthesis by glycogen synthase and glucokinase. *Biochem J*, 2000, 351, 811-816.
- Goodman, D. S.** Overview of current knowledge of metabolism of vitamin A and carotenoids. *J Nat Cancer Inst*, 1984, 73, 1375-1379.
- Goodman, D. S., & Huang, H. S.** Biosynthesis of vitamin A with rat intestinal enzymes. *Science*, 1965, 149, 879-880.
- Graham, T E., Adamo, K B., Shearer, J., Marchand, I., and Saltin, B.** Pro-and macroglycogenolysis: Relationship with exercise intensity and duration, *J Appl Physiol*, 2001, 90, 873-879.
- Granlund, A., Jensen-Waern, M., & Essén-Gustavson, B.** The influence of the PRKAG3 mutation on glycogen, enzyme activities and fibre types in different skeletal muscles of exercise trained pigs. *Acta Vet Scand*, 2011, 53 (1):20.
- Griffin, H., Grant, G., & Perry, M.** Hydrolysis of plasma triacylglycerol-rich lipoproteins from immature and laying hens (*Gallus domesticus*) by lipoprotein lipase *in vitro*. *Biochem J*, 1982, 206, 647-654.

- Grolier, P., Duszka, C., Borel, P., Alexandre-Gouabau, M-C., & Azais-Braesco, V.** *In Vitro and in Vivo inhibition of β -carotene dioxygenase activity by canthaxanthin in rat intestine.* *Arch Biochem Biophys*, 1997, 348 (2), 233-238.
- Hageman, S H., She, L., Furr, H C., & Clark, R. M.** Excess vitamin E decreases canthaxanthin absorption in the rat. *Lipids*, 1999, 43, 627-631.
- Hamade, A., Deries, M., Begemann, G., Bally-Cuif, L., Genêt, C., Sabatier, F., Bonniieu, A., & Cousin, X.** Retinoic acid activates myogenesis in vivo through Fgf8 signalling. *Dev Biol*, 2006, 289, 127-40.
- Hambrecht, E., Eissen, J. J., Newman, D. J., Smits, C. H. M., Den Hartog, L. A., & Verstegen, M. W. A.** Negative effects of stress immediately before slaughter on pork quality are aggravated by suboptimal transport and lairage conditions. *J Anim Sci*, 2005, 83, 440-448.
- Haq, A. U., Bailey, C. A., & Chinnah, A. D.** Neonatal immune response and growth performance of chicks hatched from single comb white leghorn breeders fed diets supplemented with β -carotene, canthaxanthin, or lutein. *Poult Sci*, 1995, 74, 844-851.
- Hardie, D.** New roles for the LKB1/AMPK pathway. *Curr Opin Cell Biol*, 2005, 17(2), 167-173.
- Hardie, D. G., & Sakamoto, K.** AMPK: A key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle. *Physiology*, 2006, 21, 48-60.
- Harrison, E. H.** Mechanisms involved in the intestinal absorption of dietary vitamin A and provitamin A carotenoids. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1821, 70-7.
- Hawley, S A., Davison, M., Woods, A., Davies, S P., Beri, R K., Carling, D., & Hardie, D G.** Characterisation of AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol chem*, 1996, 271, 27879-27887.
- Hebling, A., Scabora, J. E., & Esquisatto, M. A. M.** Muscle fiber types and connective tissue morphometry in frontal muscle of Norfolk rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Int J Morphol*, 2009, 27(1), 187-191.
- Herbeth, B., Gueguen, S., Leroy, P., Siest, G., Visvikis-Siest, S.** The lipoprotein lipase serine 447 stop polymorphism is associated with altered serum carotenoid concentrations in the Stanislas Family Study. *J Am Coll Nutr*, 2007, 26, 655-62.
- Herron, K. L., McGrane, M. M., Waters, D., Lofgren, I. E., Clark, R. M., Ordovas, J. M., & Fernandez, M. L.** The ABCG5 polymorphism contributes to individual responses to dietary cholesterol and carotenoids in Eggs. *J Nutr*, 2006, 136, 1161-1165.
- Hessel, S., Eichinger, A., Isken, A., Amengual, J., Hunzelmann, S., Hoeller, U., Elste, V., Hunziker, W., Goralczyk, R., Oberhauser, V., von Lintig, J., & Wyss, A.** CMO1 deficiency abolishes vitamin A production from beta-carotene and alters lipid metabolism in mice. *J Biol Chem*, 2007, 282, 33553-61.
- Hoffmann, J., Linseisen, J., Riedl, J. & Wolfram, G.** Dietary fiber reduces the antioxidative effect of a carotenoid and α -tocopherol mixture on LDL oxidation ex vivo in humans. *Eur J Nutr*, 1999, 38, 278-285.
- Hofmann, A F.** The function of bile salts in fat absorption. The solvent properties of dilute micellar solutions of conjugated bile salts. *Biochem J*, 1963, 89, 57-68.

- Hosotani, K., & Kitagawa, M.** Effects of dietary protein, fat and beta-carotene levels on beta-carotene absorption in rats. *Inter J Vit Nutr Res*, 2005, 75, 274-280.
- Howe, P., Meyer, B., Record, S., & Baghurst, K.** Dietary intake of long-chain w-3 polyunsaturated fatty acids: Contribution of meat sources. *Nutr*, 2006, 22, 47-53.
- Hudson, E. R., Pan, D. A., James, J., Lucoq, J. M., Hawley, S. A., Green K. A., Baba, O., Terashima, T., & Hardie, D. G.** A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias. *Curr Biol*, 2003, 13, 861-866.
- Huff-Lonergan, E., & Lonergan, S. M.** Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of post-mortem biochemical and structural changes. *Meat Sci*, 2005, 71, 194-204.
- Huff-Lonergan, E., Zhang, W., & Lonergan, S. M.** Biochemistry of post-mortem muscle-Lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat Sci*, 2010, 86, 184-195.
- Hughes, K., Ramakrishna, S., Benjamin, W. B., & Wodgett, J. R.** Identification of multifunctional ATP-citrate lyase kinase as the alpha isoform of glycogen synthase kinase-3. *Biochem J*, 1992, 288, 309-14.
- Huo, T., Ferruzzi, M. G., Schwartz, S. J., & Failla, M. L.** Impact of fatty acyl composition and quantity of triglycerides on bioaccessibility of dietary carotenoids. *J Agric Food Chem*, 2007, 55, 8950-8957.
- Hurley, R. L., Anderson, K. A., Franzone, J. M., Kemp, B. E., Means, A. R. & Witters, L. A.** The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *J Biol Chem*, 2005, 280, 29060-29066.
- Ihleemann, J., Ploung, T., Hellsten, Y., & Galbo, H.** Effect of stimulation frequency on contraction-induced glucose transport in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2000, 279, 862-867.
- ITAVI.** Situation de la production et des marchés avicoles. Service économie de l'ITAVI, 2011.
- IUPAC-IUB.** IUPAC commission of the nomenclature of organic chemistry and IUPAC-IUB commission on biochemical nomenclature tentative rules for the nomenclature of carotenoids. *J Biol Chem*, 1972, 247 (9), 2633-2643.
- James, W. H., & Elgindi, I. M.** The utilization of carotene 1. As affected by certain proteins in the diet of growing albino rats. *J Nutr*, 1953, 51, 97-108.
- Janisch, S., Krischek, C., & Wicke, M.** Color values and other meat quality characteristics of breast muscles collected from 3 broiler genetic lines slaughtered at 2 ages. *Poult Sci*, 2011, 90, 1774-1781.
- Jlali, M., Graulet, B., Praud, C., Chauveau-Duriot, B., Godet, E., Chabault, M., Leroux, S., Pitel, F., Le Bihan-Duval, E., Duclos, & Berri, C.** A mutation in the promoter of the chicken BCMO1 gene alters xanthophyll metabolism through a selective effect on its mRNA levels in the breast muscle. *J Anim Sci*, 2012, in revision.
- Johnson, M. S, Svensson, P. A, Helou, K., Billig, H., Levan, G., Carlsson, L. M, & Carlsson, B.** Characterization and chromosomal localization of rat scavenger receptor class B type I, a high density lipoprotein receptor with a putative leucine zipper domain and peroxisomal targeting sequence. *Endocrinology*, 1998, 139, 72-80.

- Jurie, C., Picard, B., & Geay, Y.** Changes in the metabolic and contractile characteristics of muscle in male cattle between 10 and 16 months of age. *Histochem J*, 1999, 31, 117-122.
- Kahraman, T., Bayraktaroglu, A. G., Vural, A., Issa, G., & Ergun, E.** Electron microscopy of contractile bands and quality characteristics in high-voltage electrical stimulation broiler breast meat. *Poult Sci*, 2011, 90, 486-490.
- Karadas, F., Surai, P. F., Sparks, N. H. C., & Grammenidis, E.** Effects of maternal dietary supplementation with three sources of carotenoids on the retinyl esters of egg yolk and developing quail liver. *Comp Biochem Physiol A*, 2005, 140, 430-435.
- Karadas, F., Wood, N. A. R., Surai, P. F., & Sparks, N. H. C.** Tissue-specific distribution of carotenoids and vitamin E in tissues of newly hatched chicks from various avian species. *Comp Biochem Physiol A*, 2005, 140, 506-511.
- Kiefer, C., Hessel, S., Lampert, J.M., Vogt, K., Lederer, M.O., Breithaupt, D.E., & von Lintig, J.** Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A. *J Biol Chem*, 2001, 17, 14110-14116.
- Kijowski, J., & Niewiarowicz, A.** Emulsifying properties of proteins and meat from broiler breast muscles as affected by their initial pH values. *J Food Technol*, 1978, 13, 451-459.
- Kim, J., Solis, R. S., Arias, E. B., & Cartee, G. D.** Postcontraction insulin sensitivity: relationship with contraction protocol, glycogen concentration and 5' AMP-activated protein kinase phosphorylation. *J Appl Physiol*, 2004, 96, 575-583.
- Koohmaraie, M.** Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. *Meat Sci*, 1996, 43, S193-S201.
- Kotake-Nara, E., & Nagao, A.** Absorption and metabolism of xanthophylls. *Mar Drugs*, 2011, 9, 1024-1037.
- Lage, R., Diéguez, C., Vidal-Puig, A., & López, M.** AMPK : a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends Mol Med*, 2008, 14(12), 539-549.
- Lakshman, M. R.** Alpha and omega of carotenoid cleavage. *J Nutr*, 2004, 134, 241S-245S.
- Lakshman, M. R., Liu, Q. H., Sapp, R., Somanchi, M., Sundaresan, P. R.** The effects of dietary taurocholate, fat, protein, and carbohydrate on the distribution and fate of dietary beta-carotene in ferrets. *Nutr Cancer*, 1996, 26, 49-61.
- Lang, C. H., Frost, R. A., Bronson, S. K., Christopher, J. L., & Vary, T. C.** Skeletal muscle protein balance in mTOR heterozygous mice in response to inflammation and leucine. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 298, E1283-E1294.
- Larzul, C., Le Roy, P., Monin, G., & Sellier, P.** Variabilité génétique du potentiel du muscle chez le porc. *INRA Prod Anim*, 1998, 11, 138-197.
- Lawrence, J. C. Jr., & Roach, P. J.** New insights into the role and mechanism of glycogen synthase activation by insulin. *Diabetes*, 1997, 46, 541-547.
- Lawrence, J. C., James, C., & Hicken, J. F.** Control of glycogen synthase by insulin and isoproterenol in rat adipocytes. *J Biol Chem*, 1986, 261, 669-677.
- Lawrie, R. A.** 1998. Chemical and biochemical constitution of muscle, Pages 58-94, and The Conversion of muscle to meat, Pages 96-118 in : Lawrie (Ed.), *Meat science*, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, England.

- Le Bihan-Duval, E., Berri, C., Baéza, E., Millet, N., & Beaumont, C.** Estimation of the genetics parameters of meat characteristics and of their genetic correlations with growth and body composition in an experimental broiler line. *Poult Sci*, 2001, 80, 839-843.
- Le Bihan-Duval, E., Debut, M., Berri, C., Sellier, N., Santé-Lhoutellier, V., Jégo, Y., & Beaumont, C.** Chicken meat quality: genetic variability and relationship with growth and muscle characteristics. *BMC Genet*, 2008, 9:53
- Le Bihan-Duval, E., Millet, N., & Remignon, H.** Broiler meat quality: effect of selection for increased carcass quality and estimates of genetic parameters. *Poult Sci*, 1999, 87, 822-826.
- Le Bihan-Duval, E., Nadaf, J., Berri, C., Duclos, M. J., & Pitel, F., 2010.** Marqueurs génétiques pour la coloration de la viande. License deposit 2008/08/25; n° EP2161345A1.
- Le Bihan-Duval, E., Nadaf, J., Berri, C., Pitel, F., Graulet, B., & al.** Detection of a Cis eQTL controlling BCMO1 gene expression leads to the identification of a QTG for chicken breast meat color. *Plos One*, 2011, 6(7), doi:10.1371/journal.pone.0014825.
- Leclercq, B.** The influence of dietary protein content on the performance of genetically lean and fat growing chickens. *Br Poult Sci*, 1983, 24, 581-587.
- Leclercq, B., J. C. Blum, & J. P. Boyer.** Selecting broilers for low or high abdominal fat: Initial observations. *Br Poult Sci*, 1980, 21, 107-113.
- Lee, H. L., Santé-Lhoutellier, V., Vigouroux, S., Briand, Y., & Briand, M.** Role of calpains in post-mortem proteolysis in chicken muscle. *Poult Sci*, 2008, 87, 2126-2132.
- Lee, S. H., Joo, S. T., and Ryu, Y. C.** Skeletal muscle fiber type and myofibrillar proteins in relation to meat quality. *Meat Sci*, 2010, 86, 166-70.
- Lefaucheur, L.** A second look into fibre typing-Relation to meat quality. *Meat Sci*, 2010, 84, 257-270.
- Lefaucheur, L.** Typologie et ontogenèse des fibres musculaires chez le porc. *INRA Prod Anim*, 2003, 16, 133-136.
- Leiva, A., Verdejoa, H., Benítez, M L., Martínez, A., Busso, D., & Rigotti, A.** Mechanisms regulating hepatic SR-BI expression and their impact on HDL metabolism. *Atherosclerosis*, 2011, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.05.036
- Leung, W. C., Hessel, S., Méplan, C., Flint, J., Oberhauser, V., Tourniaire, F., Hesketh, J. E., von Lintig, J., Lietz, G.** Two common single nucleotide polymorphisms in the gene encoding b-carotene 15,15'-monooxygenase alter b-carotene metabolism in female volunteers. *FASEB J*. 2009, 23, 1041-1053.
- Li, J., Bi, D., Pan, S., Zhang, Y., Zhou, D.** Effects of high dietary vitamin A supplementation on tibial dyschondroplasia, skin pigmentation and growth performance in avian broilers. *Research Vet Sci*, 2008, 84, 409-412.
- Lietz, G., Lange, J., & Rimbach, G.** Molecular and dietary regulation of β,β -carotene 15,15'-monooxygenase 1 (BCMO1). *Arch Biochem Biophys*, 2010, 502:8-16.
- Lindqvist, A., & Andersson, S.** Biochemical properties of purified recombinant human beta-carotene 15,15'-monooxygenase. *J Biol Chem*. 2002, 277, 23942-48.

- Liu, A., Nishimura, T., & Takahashi, K.** Relationship between structural properties of intramuscular connective tissue and toughness of various chicken muscles. *Meat Sci*, 1996, 43, 43-49.
- Lobo, G P., Hessel, S., Eichinger, A., Noy, N., Moise, A R., Wyss, A., Palczewski, K., & von Lintig, J.** ISX is a retinoic acid-sensitive gatekeeper that controls intestinal β , β -carotene absorption and vitamin A production. *FASEB J*, 2010, 24, 1656-1666.
- Lobo, G. P, Amengual, J., Placzewski, G., Babino, D., von Lintig, J.** Carotenoid-oxygenases: Key players for carotenoid function and homeostasis in mammalian biology. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1821, 78-87.
- Lobo, G. P., Amengual, J., Li, H. N, Golczak, M., Bonet, M. L, Palczewski, K., & von Lintig, J.** Beta, beta-carotene decreases peroxisome proliferator receptor gamma activity and reduces lipid storage capacity of adipocytes in a beta, beta-carotene oxygenase 1-dependent manner. *J Biol Chem*, 2010b, 285, 27891-9.
- Lobo, M. V., Huerta, L., Ruiz-Velasco, N., Teixeira, E., & al.** Localization of the lipid receptors CD36 and CLA-1/SR-BI in the human gastrointestinal tract: towards the identification of receptors mediating the intestinal absorption of dietary lipids. *J Histochem Cytochem*, 2001, 49, 1253-1260.
- Longnus, S. L., Wamblot, R. B., Parsons, H. L., Brownsey, R. W., & Allard, M. F.** 5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1-beta-D-ribofuranoside (AICAR) stimulates myocardial glycogenolysis by allosteric mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003, 284, 936-944.
- Love-Gregory, L., & Abumrad, N. A.** CD36 genetics and the metabolic complications of obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2011, 14, 527-34.
- Luo, J., Chen, D., & Yu, B.** Effects of different dietary sources on expression of genes related to protein metabolism in growing rats. *Br J Nutr*. 2010, 104:1421-1428.
- Lyon, B. G., Windham, W. R., Lyon, C. E., & Barton, F. E.** Sensory characteristics and near-infrared spectroscopy of broiler breast meat from various chill-storage regimes. *J Food Qual*, 2001, 24, 435-452.
- Lyon, C. E., Lyon, B. G., Papa, C. M., & Robach, M. C.** Broiler tenderness: Effects of postchill deboning time and fillet holding time. *J Appl Poult Res*, 1992, 1, 27-32.
- Mahlapuu, M., Johansson, C., Lindgren, K., Hjalms, G., Barnes, B. R., Krook, A., Zierath, J. R., Andersson, L., & Marklund, S.** Expression profiling of the gamma-subunit isoforms of AMP-activated protein kinase suggests a major rôle for gamma 3 in white skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004, 286, 194-200.
- Maltin, C., Balcerzak, D., Tilley, R., & Delday, M.** Determinants of meat quality: tenderness. *Pro Nutr Soci*, 2003, 62, 337-347.
- Mamatha, B. S., & Baskaran, V.** Effect of micellar lipids, dietary fiber and β -carotene on lutein bioavailability in aged rats with lutein deficiency. *Nutr*, 2011, 1-7.
- Mameri, H., Dupont, J., Joubert, R., Collin, A., Crochet, S., Cailleau-Audouin, E., Tesseraud, S., Métayer-Coustard, S.** Mechanisms regulating the peripheral utilisation of glucose: involvement of AMPK. International EAAP Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition ; Parma (ITA) ; 2010/09/06-10 ; EAAP publication, Vol. 127, 259-260. /Communication orale.

- Manchester, J., Skurat, A.V., Roach, P., Hauschka, S. D. & Lawrence, J. C. Jr.** Increased glycogen accumulation in transgenic mice overexpressing glycogen synthase in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci*, 1996, 1 93, 10707-11.
- McKee, S. R. & Sams, A. R.** Rigor mortis development at elevated temperature induces pale exudative turkey meat characteristics. *Poult Sci*, 1998, 77: 169-174.
- McVeigh, J. M., Tarrant, P. V., & Harrington, M. G.** Behavioral stress and skeletal muscle glycogen metabolism in young bulls. *J Anim Sci*, 1982, 54, 790-795.
- Mein, J. R., Dolnikowski, G. G., Ernst, H., Russell, R. M., & Wang, X. -D.** Enzymatic formation of apo-carotenoids from the xanthophyll carotenoids lutein, zeaxanthin and β -cryptoxanthin by ferret carotene-9',10'-monooxygenase. *Arch Biochem Biophys*, 2011, 506, 109-121.
- Mercier, Y., Berri, C., Baéza, E., Bordeau, T., Chartrin, P., Mercierand, F., Geraert, P. A.** Improvement of muscle oxidative stability and processing yield in relation with dietary methionine sources. Poultry Science Association 98th Annual meeting. Raleigh, North Carolina (USA) 2009/07/20-23. Abstract 117.
- Milan, D., Jeon, J.T., Looft, C., Amarger, V., Robic, A., Thelander, & al.** A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. *Science*, 2000, 288, 1248-1251.
- Miller, R. K. 1994.** Chapter 11 Quality Characteristics. In: *Muscle Foods* (Eds D.M. Kinsman, A.W. Kotula and B.C. Breidenstein), pp. 296-332. Chapman & Hall, Inc., New York, USA.
- Molette, C.** Analyse protéomique d'alterations de propriétés sensorielles et technologiques de la viande de dinde. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, 2004, 171p.
- Monin, G. & Sellier, P.** Pork of low technological quality with a normal rate of muscle pH fall in the immediate post mortem period: The case of the Hampshire breed. *Meat Sci*, 1985, 13, 49-63.
- Monin, G.** Évolution post-mortem du tissu musculaire et conséquences sur les qualités de la viande de porc. In : *20^{es} Journées de la Recherche Porcine, Paris, France, 2,3 et 4 Février 1988*. ITP, INRA, 1988, 201-213.
- Monin, G.** Facteurs biologiques des qualités de la viande bovine. *INRA Prod Anim*, 1991, 4, 151-160.
- Monsón, F., Sañudo, C., & Sierra, I.** Influence of cattle breed and ageing time on textural meat quality. *Meat Sci*, 2004, 68, 595-602.
- Moody, J. E., Millen, L., Binns, D., Hunt, J. F., & Thomas, P. J.** Cooperative, ATP-dependent association of the nucleotide binding cassette during the catalytic cycle of ATP-binding cassette transporters. *J Biol Chem*, 2002, 277, 21111-21114.
- Morita, S., Iwamoto, H., Fukumitsu, Y., Gotoh, T., Nishimura, S., & Ono, Y.** Heterogeneous composition of histochemical fibre types in the different parts of M. longissimus thoracis from Mishima (Japanese native) steers. *Meat Sci*, 2000, 54, 59-63.
- Morzel, M., Terlouw, C., & Laville, E.** Relations entre le métabolisme post mortem et les qualités des viandes: Apports de la protéomique. 11^{èmes} JSMTV, Clermont Fd, 2006. 191-195.

- Mossab, A., Guillaumin, S., Lessire, M., Milliat, F., & Hermier, D.** Plasma lipoprotein distribution in the turkey (*Meleagris gallopavo*). *Com Biochem Physiol B*, 2001, 130, 227-235.
- Moussa, M., Gouranton, E., Gleize, B., Yazidi, C. E., Niot, I., Besnard, P., Borel, P., Borel, P., & Landrier, J.-F.** CD36 is involved in lycopene and lutein uptake by adipocytes and adipose tissue cultures. *Mol Nutr Food Res*, 2011, 55, 578-584.
- Moussa, M., Landrier, J. F., Reboul, E., Ghiringhelli, O., & al.** Lycopene absorption in human intestinal cells and in mice involves scavenger receptor class B type I but not Niemann-Pick C1-like 1. *J Nutr*, 2008, 138, 1432-1436.
- Mulligan, J. D., Flowers, M. T., Tebon, A., Bitgood, J. J., Wellington, C., Hayden, M. R., & Attie, A. D.** ABCA1 is essential for efficient basolateral cholesterol efflux during the absorption of dietary cholesterol in chickens. *J Biol Chem*, 2003, 278, 13356-13366.
- Murphy, R. Y., & Marks, B. P.** Effect of meat temperature on proteins, texture, and cook loss for ground chicken breast patties. *Poult Sci*, 2000, 79, 99-104.
- Musa, H. H., Chen, G. H., Cheng, J. H., Shuiep, E. S., & Bao, W. B.** Breed and sex effect on meat quality of chicken. *Int J Poult Sci*, 2006, 5, 566-568.
- Musi, N., Fujii, N., Hirshman, M. F., Ekberg, I., Fröberg, S., Ljungqvist, O., Thorell, A., & Goodyear, L. J.** AMP-activated protein kinase (AMPK) is activated in muscle of subjects with type 2 diabetes during exercise. *Diabetes*, 2001, 50, 921-927.
- Na, J.-C., Song, J.-Y., Lee, B. D., Lee, S.-J., Lee, C.-J., & An, G.-H.** Effect of polarity on absorption and accumulation of carotenoids by laying hens. *Anim Feed Sci Technol*, 2004, 117, 35-315.
- Nadaf, J., Gilbert, H., Pitel, F., Berri, C., Fève, K., & al.** Identification of QTL controlling meat quality traits in an F₂ cross between two chicken lines selected for either low or high growth rate. *BMC Genomics*, 2007, 8, 155.
- Nadaf, J., Pitel, F., Gilbert, H., Duclos, M. J., Vignoles, F., Beaumont, C., Vignal, A., Porter, T. E., Cogburn, L. A., Aggrey, S. E., Simon, J., & Le Bihan-Duval, E.** QTL for several metabolic traits map to loci controlling growth and body composition in an F₂ intercross between high- and low-growth chicken lines. *Physiol Genomics*, 2009, 38, 241-9.
- Nielsen, J. N., & Wojtaszewski, J. F.** Regulation of glycogen synthase activity and phosphorylation by exercise. *Proc Nutr Soc*, 2004, 63, 233-237.
- Nierenberg, D. W., Stukel, T. A., Mott, L. A., & Geenberg, E. R.** Steady-state serum concentration of alpha tocopherol not altered by supplementation with oral beta carotene. *J Natl Cancer Inst*, 1994, 86, 117-120.
- Northcutt, J. K., Buhr, R. J., Young, L. L., Lyon, C. E., & Ware, G. O.** Influence of age and postchill carcass aging duration on chicken breast fillet quality. *Poult Sci*, 2001, 80, 808-812.
- Nys, Y.** Dietary carotenoids and egg yolk coloration- a review. *Archiv geflügelk*, 2000, 64, 45-54.
- Offer, G., & Knight, P.** 1988. The structural basis of water-holding in meat. In R. A. Lawrie (Ed.), *Developments in meat science*, 4, London: Elsevier.

- Okar, D. A., Manzano, A., Navarro-Sabatè, A., Riera, L., Bartrons, R.** PFK-2/FBPase-2: marker and breaker of the essential biofactor fructose-2, 6-bisphosphate. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26, 30-35.
- Olomu, J. M., & Baracos, V. E.** Influence of dietary flaxseed oil on the performance, muscle protein deposition and fatty acid composition of broiler chicks. *Poult Sci*, 1991, 70, 1403-1411.
- Olson, J. A.** Provitamin A function of carotenoids: the conversion of β -carotene into vitamin A. *J Nutr*, 1989, 119, 105-108.
- Oram, J. F., & Lawn, R. M.** ABCA1: the gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. *J Lipid Res*, 2001, 42, 1173-9.
- Ortega, H., Castilla, P., Gomez-Coronado, D., Garcés, C., Benavente, M., Rodriguez-Artalejo, F., de Oya, M., Lasuncio, M. A.** Influence of apolipoprotein E genotype on fat-soluble plasma antioxidants in Spanish children. *Am J Clin Nutr*, 2005, 81, 624-632.
- Ouali, A., & Talmant, A.** Calpains and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal muscle. *Meat Sci*, 1990, 28 (4), 331-348.
- Ouhayoun, J.** Influence of the diet on rabbit meat quality. The nutrition of the rabbit. *CAB International*, 1998, 177-195.
- Ouhayoun, J., & Dalle-Zotte, A.** Muscular energy metabolism and related traits in rabbit-A review. *World Rabbit Sci*, 1993, 1, 97-108.
- Ozawa, S., Mitsuhashi, T., Mitsumoto, M., Matsumoto, S., & al.** The characteristics of muscle fiber types of *longissimus thoracis* muscle and their influences on the quantity and quality of meat from Japanese Black steers. *Meat Sci*, 2000, 54, 65-70.
- Papinaho, P., Ruusumen, M., Suuronen, T., & Fletcher, D.** Relationship between muscle biochemical and meat quality properties of early deboned broiler breast. *J Appl Poult Res*, 1996, 5, 126-133.
- Parker, P. J., Caudwell, F. B., & Cohen, P.** Glycogen synthase from rabbit skeletal muscle; effect of insulin on the state of phosphorylation of the seven phosphoserine residues in vivo. *Eur J Biochem*, 1983, 130, 227-234.
- Parker, R.S.** Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *FASEB J*, 1996, 10, 542-51.
- Parvin, S. G., & Sivakumar, B.** Nutritional status affects intestinal carotene cleavage activity and carotene conversion to vitamin A in rats. *J Nutr*, 2000, 130, 573-577.
- Pearce, K. L., Rosenvold, K., Andersen, H. J., & Hopkins, D. L.** Water distribution and mobility in meat during the conversion of muscle to meat and ageing and the impacts of fresh meat quality attributes-A review. *Meat Sci*, 2011, 89, 111-124.
- Peter, J. B., Barnard, R. J., Edgerton, V. R., Gillespie, C. A., Stempel, K. E.** Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pig and rabbits. *Biochemistry*, 1972, 11, 2627-33.
- Picard, B., Jurie, C., Cassar-Malek, I., Hocquette, J. -F., Lefaucheur, L., Berri, C., Duclos, M. J., Alami-Durante, H., & Rescan, P. Y.** Typologie et ontogenèse des fibres musculaires chez différentes espèces d'intérêt agronomique. *INRA Prod Anim*, 2003, 16 (2), 117-123.

- Pickett-Gies, C.A. & Walsh, D.A.** Phosphorylase kinase. *Enzymes*, 1986, 17, 395-459.
- Pinchasov, Y., Nir, I., & Nitsan, Z.** Muscle growth and composition in heavy and light breed chickens adapted to intermittent feeding. *Br J Nutr*, 1989, 61, 245-256.
- Polekhina, G., Gupta, A., Michell, B. J., van Denderen, B., Murthy, S., Feil, S. C., Jennings, I. G., Campbell, D. J., Witters, L. A., Parker, M. W., Kemp, B. E., & Stapleton, D.** AMPK beta subunit targets metabolic stress sensing to glycogen. *Curr Biol*, 2003, 13, 867-71.
- Ponte, P. I. P., Alves, S. P., Bessa, R. J. B., Ferraira, L. M. A., Gama, L. T., Bras, J. L. A., Fontes, C. M. G. A., & Prates, J. A. M.** Influence of pasture intake on the fatty acid composition, and cholesterol, tocopherols, and tocotrienols content in meat from free-range broilers. *Poult Sci*, 2008, 87, 80-88.
- Poso, A. R., & Puolanne, E.** Carbohydrate metabolism in meat animals. *Meat Sci*, 2005, 70, 423-434.
- Queiroz-Claret, C., Jolivet, P., Chardot, T., Bergeron, E., & Meunier, J. -C.** Time coordinated control of glycogen synthase, protein phosphatase 2A and protein kinase CK2 during culture growth in *Yarrowia lipolytica* in relation with glycogen metabolism. *C R Acad Sci*, 2000, 323, 257-266.
- Rabot, C.** Vitesse de croissance et caractéristiques lipidiques et sensorielles des muscles de poulet. Thèse de 3^è cycle, Institut national agronomique Paris-Grignon, 19 février 1998.
- Rahelić, S., Gawwadt, A. H., & Puač, S.** Structure of beef *Longissimus dorsi* muscle frozen at various temperatures: Part 2-ultrastructure of muscles Frozen at -10, -22, -33, -78 and -115°C. *Meat Sci*, 1985, 14, 73-81.
- Rasmussen, B B., & Winder, W. W.** Effect of exercise intensity on skeletal muscle malony-CoA and acetyl-CoA carboxylase. *J Appl Physiol*, 1997, 83, 1104-1109.
- Rathgeber, B. M., Boles, J. A., & Shand, P. J.** Rapid post-mortem pH decline and delayed chilling reduce quality of turkey breast meat. *Poult Sci*, 1999, 78, 477-484.
- Reboul, E., Abou, L., Mikail, C., Ghiringhelli, O., & al.** Lutein transport by Caco-2 TC-7 cells occurs partly by a facilitated process involving the scavenger receptor class B type I (SR-BI). *Biochem J*, 2005, 387, 455-461.
- Reboul, E., Borel, P.** Proteins involved in uptake, intracellular transport and basolateral secretion of fat-soluble vitamins and carotenoids by mammalian enterocytes. *Progress in Lipid Research*, 2011, 50, 388-402.
- Reboul, E., Goncalves, A., Comera, C., Bott, R., & al.** Vitamin D intestinal absorption is not a simple passive diffusion: Evidences for involvement of cholesterol transporters. *Mol Nutr Food Res*, 2011, 55, 691-702.
- Reboul, E., Klein, A., Bietrix, F., Gleize, B., Malezet-Desmoulins, C., Schneider, M., Margotat, A., Lagrost, L., Collet, X., & Borel, P.** Scavenger receptor class B type I (SR-BI) is involved in vitamin E transport across the enterocyte. *J Biol Chem*, 2006, 281, 4739-4745.
- Reboul, E., Tromprier, D., Moussa, M., Klein, A., Landrier, J-F., Chimini, G., & Borel, P.** ATP-binding cassette transporter A1 is significantly involved in the intestinal absorption of α - and γ -tocopherol but not in that of retinyl palmitate in mice. *Am J Clin Nutr*, 2009, 89, 177-84.

- Redmond, T. M., Gentleman, S., Duncan, T., Yu, S., Wiggert, B., & al.** Identification, expression, and substrate specificity of a mammalian beta-carotene 15,15'-dioxygenase. *J Biol Chem*, 2001, 276 (9), 6560-6565.
- Rémignon, H., Desrosiers, V., & Marché, G.** Influence of increasing breast meat yield on muscle histology and meat quality in the chicken. *Reprod Nutr Dev*, 1996, 36, 523-530.
- Rhoades, R. D., King, D. A., Jenschke, B. E., Behrends, J. M., Hively, T S., & Smith, S. B.** Postmortem regulation of glycolysis by 6-phosphofructokinase in bovine *M. Sternocephalicus pars mandibularis*. *Meat Sci*, 2005, 70, 621-626.
- Ribaya-Mercado, J. D., Solon, F. S., Solon, M. A., Cabel-Barza, M. A., Perfecto, C. S., Tang, G., Solon, J. A., Fjeld, C. R., & Russel, R. M.** Bioconversion of plant carotenoids to vitamin A in Filipino school-aged children varies inversely with vitamin A status. *Am J Clin Nutr*, 2000, 72, 455-465.
- Ricard, F. H.** Essai de sélection sur la forme de la courbe de croissance chez le poulet. *Ann Génét Sél Anim*, 1975, 7, 427-443.
- Ricard, F. H., Leclercq, B., & Touraille, C.** Selecting broilers for low or high abdominal fat: distribution of carcass fat and quality of meat. *Br Poult Sci*, 1983, 24, 511-516.
- Riedl, J., Linseisen, J., Hoffmann, J., & Wolfram, G.** Some dietary fibers reduce the absorption of carotenoids in women. *J Nutr*, 1999, 129, 2170-2176.
- Rigotti, A.** Function and regulation of hepatic scavenger receptor class B type I (SR-BI). *International Congress Series*, 2004, 1262, 527-530.
- Rigotti, A., Miettinen, H E., & Krieger, M.** The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. *Endocr Rev*, 2003, 24(3), 357-87.
- Roach, P J.** Multisite and hierarchal protein phosphorylation. *J Biol Chem*, 1991, 266, (22), 14139-14142.
- Roach, P. J.** Glycogen and its metabolism. *Curr Mol Med*, 2002, 2 (2), 101-120.
- Rock, C.L., Lovalvo, J. L., Emenhiser, C., Ruffin, M.T., Flatt, S.W., & Schwartz, S. J.** Bioavailability of beta-carotene is lower in raw than in processed carrots and spinach in women. *J Nutr*, 1998, 128, 913-916.
- Roodenburg, A. J. C., Leenen, R., Hof, K. H. V., Weststrate, J. A., & Tijburg, L. B. M.** Amount of fat in the diet affects bioavailability of lutein esters but not of alpha-carotene, beta-carotene, and vitamin E in humans. *Am J Clin Nutr*, 2000, 71, 1187-93.
- Rosenvold, K., Lærke, H. N., Jensen, S. K., Karlsson, A., Lundström, L., & Andersen, H. J.** Manipulation of critical quality indicators and attributes in pork through vitamin E supplementation, muscle glycogen reducing finishing feeding and pre-slaughter stress. *Meat Sci*, 2002, 62, 485-496.
- Ruderman, N. B., Saha, A. K., Vavvas, D., & Witters, L. A.** Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am J Physiol*, 1999, 276, 1-18.
- Ryu, Y. C., & Kim, B. C.** Comparaison of histochemical characteristics in various pork groups categorized by post-mortem metabolic rate and pork quality. *J Anim Sci*, 2006, 84, 894-901.

- Ryu, Y. C., & Kim, B. C.** The relationship between muscle fiber characteristics, postmortem metabolism rate, and meat quality of pig *longissimus dorsi* muscle. *Meat Sci*, 2005, 71, 351-357.
- Santé, V., Fernandez, X., Monin, G., & Renou, J. -P.** Nouvelles méthodes de mesure de la qualité des viandes de volailles. *INRA Prod Anim*, 2001, 14(4), 247-254.
- Sato, K., Suzuki, K., & Akiba, Y.** Characterisation of chicken portomicron remnant and very low density lipoprotein remnant. *Poult Sci*, 2009, 46, 35-39.
- Sauveur, B.** Les critères et facteurs de la qualité des poulets Label Rouge. *INRA Prod Anim*, 1997, 10, 219-226.
- Scheffler, T L., & Gerrard, D E.** Mechanisms controlling pork quality development: The biochemistry controlling postmortem energy metabolism. *Meat Sci*, 2007, 77, 7-16.
- Scheffler, T. L., Park, S., & Gerrard, D. E.** Lessons to learn about postmortem metabolism using the AMPK γ 3^{R200Q} mutation in the pig. *Meat Sci*, 2011, 89, 244-250.
- Schiaffino, S., & Reggiani, C.** Molecular diversity of myofibrillar proteins: Gene regulation and functional significance. *Physiol Rev*, 1996, 76, 371-423.
- Schiaffino, S., & Reggiani, C.** Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 1994, 77, 493-501.
- Schliselfeld, L. H., & Danon, M. J.** Use of fructose-2,6-diphosphate to assay for phosphofructokinase activity in human muscle. *Clin Biochem*, 1996, 29, 79-83.
- Schreurs, E. J. G.** Post mortem changes in chicken muscle. *World's Poult Sci J*, 2000, 56, 319-346.
- Schreurs, E. J. G.** Tenderness changes during the conversion of muscle to meat. In: Lambooij, E, *Proceedings satellite symposium "Developments of new humane stunning and related processing methods for poultry to improve product quality and consumer acceptability, Poznan, Poland, September 21-26.* European Symposium on the Quality of Poultry Meat, 1997, 257-269.
- Scita, G.** Stability of β -carotene under different laboratory conditions. *Methods Enzymol*, 1993, 214, 175-185.
- Seino, Y., Miki, T., Kiyonari, H., Abe, T., Fujimoto, W., Kimura, K., Takeuchi, A., Takahashi, Y., Oiso, Y., Iwanaga, T., & Seino, S.** Isx participates in the maintenance of vitamin A metabolism by regulation of beta-carotene 15,15-monooxygenase (Bcmo1) expression. *J Biol Chem*, 2008, 283, 4905– 4911.
- Seki, Y., Sato, K., Kono, T., & Akiba, Y.** two types of phosphofructokinase-1 differentially regulate the glycolytic pathway in insulin-stimulated chicken skeletal muscle. *Comp Biochem Physiol B*, 2006, 143, 344-350.
- Shen, Q W., Means, W J., Thompson, S A., Underwood, K R., Zhu, M J., McCormick, R J., Ford, S P., & Du, M.** Pre-slaughter transport, AMP-activated protein kinase, glycolysis, and meat quality of pork loin. *Meat Sci*, 2006b, 74, 388-395.
- Shen, Q W., Zhu, M J., Tong, J., Ren, J., & Du, M.** Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase is involved in AMP-activated protein kinase activation by α -lipoic acid in C2C12 myotubes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 293, C1395-C1403.
- Shen, Q. W., & Du, M.** Role of AMP-activated protein kinase in the glycolysis of postmortem muscle. *J Sci Food Agric*, 2005, 85, 2401-2406.

- Shen, Q. W., Gerrard, D. E., & Du, M.** Compound C, an inhibitor of AMP-activated protein kinase, inhibits glycolysis in mouse longissimus dorsi postmortem. *Meat Sci*, 2008, 78, 323-330.
- Shen, Q. W., Means, W. J., Underwood, K. R., Thompson, S A., Zhu, M. J., McCormick, Ford, S. P., Ellis, M., & Du, M.** Early post-mortem AMP-activated protein kinase (AMPK) activation leads to phosphofructokinase-2 and -1 (PFK-2 and PFK-1) phosphorylation and the development of Pale, Soft, and Exudative conditions in porcine Longissimus muscle. *J Agri Food Chem*, 2006a, 54, 5583-5589.
- Shulman, R. G., & Rothman, D. L.** The “glycogen shunt” in exercising muscle: a role for glycogen in muscle energetics and fatigue. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, USA, 98, 457-461.
- Sibut, V., Hennequet-Antier, C., Le Bihan-Duval, E., Marthey, S., Duclos, M. J., & Berri, C.** Identification of differentially expressed genes in chickens differing in muscle glycogen content and meat quality. *BMC Genomics*, 2011, 12:112.
- Sibut, V., Le Bihan-Duval, E., Tesseraud, S., Godet, E., Bordeau, T., Cailleau-Audouin, E., P. Chartrin, Duclos, M. J., & Berri, C.** AMP-activated protein kinase involved in the variations of muscle glycogen and breast meat quality between lean and fat chickens. *J Anim Sci*, 2008, 86 (11), 2888-2896.
- Simon, J., & Leclercq, B.** Longitudinal-study of adiposity in chickens selected for high or low abdominal fat-content. Further evidence of a glucose-insulin imbalance in the fat line. *J Nutr*, 1982, 198, 1961-1973.
- Skarovsky, C. J., & Sams, A. R.** Tenderness, moisture loss and post-mortem metabolism of broiler Pectoralis muscle from electrically stimulated and air chilled carcasses. *Br Poult Sci*, 1999, 40, 622-625.
- Skurat, A. V., & Dietrich, A. D.** Phosphorylation of Ser640 in muscle glycogen synthase by DYRK family protein kinases. *J Biol Chem*, 2004, 279, 2490–2498.
- Skurat, A. V., Dietrich, A. D., & Roach, P. J.** Interaction between glycogen and glycogen synthase. *Arch Biochem Biophys*, 2006, 456, 93-97.
- Smerdu, V., Karsch-Mizrachi, I., Campione, M., Leinwand, L., & Schiaffino, S.** Type Iix myosin heavy chain transcripts are expressed in type Iib fibers of human skeletal muscles. *Am J Physiol*, 1994, 267, 1723-1728.
- Smith, D. P., & Fletcher, D. L.** Chicken breast muscle fiber type and diameter as influenced by age and intramuscular location. *Poult Sci*, 1988, 67, 908-913.
- Snodderly, D. M.** Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *Am J Clin Nutr*, 1995, 62:1448S-1461S.
- Steinmetz, A., Hermann, M., Nimpf, J., Aebersold, R., & Schneider, W. J.** Expression and conservation of apolipoprotein AIV in an avian species. *J Biol Chem*, 1998, 273, 10543-10549.
- Stephens, T. J., Chen, Z. P., Canny, B. J., Michell, B. J., Kemp, B. E., & McConell, G. K.** Progressive increase in human skeletal muscle AMPK alpha 2 activity and ACC phosphorylation during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002, 282, 688-694.
- Sunde, M. L.** Symposium: The scientific way to pigment poultry products. Title: Introduction to the Symposium. *Poult Sci*, 1992, 71, 709-710.

- Surai, P. F. 2002.** Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction. Nottingham University Press.
- Surai, P. F., & Sparks, N. H. C.** Comparative evaluation of the effect of two maternal diets on fatty acids, vitamin E and carotenoids in the chick embryo. *Br J Poult Sci*, 2001, 42(2), 252-259.
- Surai, P. F., & Speake, B. K.** Distribution of carotenoids from the yolk to the tissues of the chick embryo. *J Nutr Biochem*, 1998, 9, 645-651.
- Surai, P. F., Speake, B. K., & Sparks, N. H. C.** Carotenoids in avian nutrition and embryonic developments. 1. Absorption, availability and levels in plasma and egg yolk. *Poult Sci*, 2001, 38, 1-27.
- Surai, P. F., Speake, B. K., Wood, N. A. R., Blount, J. D., Bortolotti, G. R., & Sparks, N. H. C.** Carotenoid discrimination by the avian embryo: a lesson from wild birds. *Comp Biochem Physiol B*, 2001, 128, 743-750.
- Suter, M., Riek, U., Tuerk, R., Schlattner, U., Wallimann, T., & Neumann, D.** Dissecting the role of 5-AMP for allosteric stimulation, activation and deactivation of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 2006, 1-20.
- Swartz, D. R., Greaser, M. L., & Marsh, B. B.** Structural studies of rigor bovine myofibrils using fluorescence microscopy. I. Procedures for purification and modification of bovine muscle proteins for use in fluorescence microscopy. *Meat Sci*, 1993, 33, 139-155.
- Tajima, S., Goda, T., & Takase, S.** Co-ordinated induction of β -carotene cleavage enzyme and retinal reductase in the duodenum of the developing chicks. *Comp Biochem Physiol B*, 2001, 128, 425-434.
- Takahashi, K.** Structural weakening of skeletal muscle tissue during post mortem ageing of meat: The non-enzymatic mechanism of meat tenderization. *Meat Sci*, 1996, 43, 67-80.
- Takitani, K., Zhu, C. L., Inoue, A., & Tamai, H.** Molecular cloning of the rat β -carotene 15,15'-monooxygenase gene and its regulation by retinoic acid. *Eur J Nutr*. 2006, 45:320-326.
- Tee, E.** Carotenoids and retinoids in human nutrition. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1992, 31, 103-63.
- Terpstra, V., van Amersfoort, E. S., van Velzen, A. G., Kuiper, J., & van Berkel, T. J.** Hepatic and extrahepatic scavenger receptors: function in relation to disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20, 1860-1872.
- Tesseraud, S., Métayer-Coustard, S., Seilliez, I. & Berri, C.** Rôle des acides aminés soufrés dans le contrôle du métabolisme, de la croissance et de la qualité des produits. Rapport final Contrat de Recherches INRA-ADISSEO (Rhodimet Research Grant 2008-2010). 2011. 54 pages.
- Tian, R., Pitchford, W. S., Morris, C. A., Cullen, N. G., & Bottema, C. D. K.** Genetic variation in the β , β -carotene-9',10'-dioxygenase gene and association with fat colour in bovine adipose tissue and milk. *Anim. Genetics*. 2009, 41(3), 253-259.
- Tikk, K., Lindahl, G., Karlsson, A. H. & Andersen, H. J.** The significance of diet, slaughter weight and aging time on pork colour and colour stability. *Meat Sci*, 2008, 79, 806-816.

- Tortora, G. J., Grabowski, S. R.** Principe d'anatomie et de physiologie. Université Anjou, Centre Educatif et Culture, Quebec, 1994.
- Touraille, C., Lassaut, B. and Sauvageot, F.** Qualites organoleptiques de viandes de poulets labels. Organoleptic quality of meat from 'Label' chickens. *Viandes et Produits Carnés*, 1985, 6, 67-72.
- Toyomizu, M., Sato, K., Taroda, H., Kato, T., & Akiba, Y.** Effects of dietary Spirulina on meat colour in muscle of broiler chickens. *Br Poult Sci*, 2001, 42 (2), 197-202.
- Våge, D. I, Boman, I. A.** A nonsense mutation in the beta-carotene oxygenase 2 (BCO2) gene is tightly associated with accumulation of carotenoids in adipose tissue in sheep (*Ovis aries*). *BMC Genet*, 2010, Feb 2;11:10.
- Valin, C.** Différenciation du tissu musculaire. Conséquences technologiques pour la filière viande. *Reprod Nutr Devlop*, 1988, 28, 845-856.
- van Bennekum, A., Werder, M., Thuahnai, S T., Han, C-H., Duong, P., Williams, D L., Wettstein, P., Schulthess, G., Phillips, M C., & Hauser, H.** Class B scavenger receptor-mediated intestinal absorption of dietary β -carotene and cholesterol. *Biochemistry*, 44, 4517-4525.
- van den Berg, H., & van Vliet, T.** Effect of simultaneous, single oral doses of β -carotene with lutein or lycopene on the β -carotene and retinyl ester responses in the triacylglycerol-rich lipoprotein fraction of men. *Am J Clin Nutr*, 1998, 68, 82-9.
- van het Hof, K. H., West, C. E., Weststrate, J. A., & Hautvast, J. G. A. J.** Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *J Nutr*, 2000, 130, 503-506.
- Van Laack, R. L. J. M., Liu, C. H., Smith, M. O., & Loveday, H. D.** Charcteristics of pale, soft, exudative broiler breast meat. *Poult Sci*, 2000, 79, 1057-1061.
- van Vliet, T., van Vlissingen, M. F., van Schaik, F., & van den Berg, H.** Beta-carotene absorption and cleavage in rats is affected by the vitamin A concentration of the diet. *J Nutr*, 1996, 126, 499-508.
- Veeramuthu, G. I., & Sams, A. R.** Postmortem pH, myofibrillar fragmentation, and calpain activity in pectoralis from electrically stimulated and muscle tensioned broiler carcasses. *Poult Sci*, 1999, 78, 272-276.
- Vishwanathan, R., Gendron, C. M., Goodrow-Kotyla, E. F., Wilson, T. A., & Nicolosi, R. J.** Increased consumption of dietary cholesterol, lutein, and zeaxanthin as egg yolks does not decrease serum concentrations and lipoprotein distribution of other carotenoids, retinol, and tocopherols. *Nutr Res*, 2010, 30, 747-755.
- von Lengerken, G. V., Maak, S., & Wicke, M.** Muscle metabolism and meat quality of pig and poultry. *Veterinarija Ir Zootechnika*, 2002, 20, 82-86.
- von Lintig, J.** Colors with functions: elucidating the biochemical and molecular basis of carotenoid metabolism. *Annu Rev Nutr*, 2010, 30, 35-56.
- von Lintig, J., & Vogt, K.** Filling the gap in vitamin A research. Molecular identification of an enzyme cleaving beta-carotene to retinal. *J Biol Chem*, 2000, 275, 11915-11920.
- von Lintig, J., & Wyss, A.** Molecular analysis of vitamin A formation: cloning and characterization of β -carotene 15,15'-dioxygenases. *Arch Biochem Biophys*, 2001, 385, 47-52.

- Wang, W., Connor, S L., Johnson, E J., Klein, M L., Hughes, S., & Connor, W E.** Effect of dietary lutein and zeaxanthin on plasma carotenoids and their transport in lipoproteins in age-related macular degeneration. *Am J Clin Nutr*, 2007a, 85, 762-769.
- Wang, X. -D.** Absorption and metabolism of β -carotene. *J Am Coll Nutr*, 1994, 13, 314-325.
- Wang, Y M., Connor, S L., Wang, W., Johnson, E J., & Connor, W E.** The selective retention in the retina of chicks fed a xanthophylls-free diet. *Exp Eye Res*, 2007b, 84, 591-598.
- Wang, Y., & Roach, P. J.** Inactivation of rabbit muscle glycogen synthase by glycogen synthase kinase-3. Dominant role of the phosphorylation of Ser-640 (site-3a). *J Biol Chem*, 1993, 268, 23876-23880.
- Wang, Y., Illingworth, D. R., Connor, S. L., Duell, P. B., & Connor, W. E.** Competitive inhibition of carotenoid transport and tissue concentrations by high dose supplements of lutein, zeaxanthin and beta-carotene. *Eur J Nutr*, 2010b, 49, 327-336.
- Warris, P. D., Kestin, S. C., Brown, S. N., & Bevis, E. A.** Depletion of glycogen reserves in fasting broiler chickens. *Br Poult Sci*, 1988, 29, 149-154.
- Wattanachant, S., Benjakul, S., & Ledward, D. A.** Composition, color, and texture of Thai indigenous and broiler chicken muscles. *Poult Sci*, 2004, 83, 123-128.
- Weiser, H, & Kormann, A.** Provitamin A activities and physiological functions of carotenoids in animals. Relevance to human health. In: Canfield, L M., Krinsky, N I., and Olson, J A., *Carotenoids in Human Health*. New York: New York Academy of Science, 1993, 691, 213-215.
- Wellington, C. L., Walker, E. K. Y., Suarez, W., & al.** ABCA1 mRNA and protein distribution patterns predict multiple different roles and levels of regulation. *Lab Invest*, 2002, 82, 273-283.
- Williams, A. W., Boileau, T. W. M., & Erdman, J. W. Jr.** Factors influencing the uptake and absorption of carotenoids. *Proc Soci Exp Biol Med*, 1998, 218, 106-108.
- Winder, W. W.** Energy-sensing and signaling by AMP-activated protein kinase in skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 2001, 91, 1017-1028.
- Winder, W. W., & Hardie, D. G.** AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am J Physiol*, 1999, 277, 1-10.
- Woelfel, R. L., Owens, C. M., Hirschler, E. M., & Sams, A. R.** The incidence and characterization of pale, soft and exudative chicken meat in commercial plant. *Poult Sci*, 1998, 77 (suppl.1): 62.
- Wood, D. F., & Richards, J. F.** Effect of some antemortem stressors on post-mortem aspects of chicken broiler *Pectoralis muscle*. *Poult Sci*, 1975, 54:528-531.
- Woods, A., Cheung, P. C. F., Smith, F. C., Davison, M. D., Scott, J., Beri, R. K., & Carling, D.** Characterization of AMP-activated protein kinase β and γ subunits. *J Biol Chem*, 1996, 271 (17), 10282-10290.
- Woods, A., Vertommen, D., Neuman, D., Turk, R., Bayliss, J., Schlattner, U., Wallimann, T., Carling, D., & Rider, M. H.** Identification of phosphorylation sites in AMP-activated protein kinase (AMPK) for upstream AMPK kinases and study of their rôles by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, 2003, 278, 284-344.

- Wyss, A. Carotene oxygenases: a new family of double bond cleavage enzymes. *J Nutr*, 2004, 134, 246S-250S
- Wyss, A., Wirtz, G. M., Woggon, W., Brugger, R., Wyss, M., Friedlein, A., Riss, G., Bachmann, H., & Hunziker, W. Expression pattern and localization of β , β -carotene 15,15'-dioxygenase in different tissues. *Biochem J*, 2001, 354, 521-529.
- Wyss, A., Wirtz, G., Woggon, W., Brugger, R., Wyss, M., Friedlein, A., Bachmann, H., & Hunziker, W. Cloning and expression of β , β -carotene-15,15'-dioxygenase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 271, 334-336.
- Xiong, Y. L., Cantor, A. H., Pescator, A. J., Blanchard, S. P., & Straw, M. L. Variations in muscle chemical composition, pH, and protein extractability among eight different broiler crosses. *Poult Sci*, 1993, 72, 583-588.
- Yalçın, S., Özkul, H., Öskan, S., Gous, R., Yaşa, I., & Babacanoğlu, E. Effect of dietary protein regime on meat quality traits and carcass nutrient content of broilers from two commercial genotypes. *Br Poult Sci*, 2010, 51, 621-628.
- Yamaguchi, N., Yamamoto, T., Suruga, K., & Takase, S. Developmental changes in gene expression of β -carotene cleavage enzyme and retinoic acid synthesizing enzymes in the chick duodenum. *Comp Biochem Physiol A*, 2007, 148, 690-697.
- Yan, W., Jang, G-F., Haeseleer, F., Esumi, N., Chang, J., Kerrigan, M., Campochiaro, M., Campochiaro, P., Palczewski, K., & Zack, D. Cloning and characterization of a human β , β -carotene-15,15'-dioxygenase that is highly expressed in the retinal pigment epithelium. *Genomics*, 2001, 72, 193-202.
- Yeum, K -J., & Russel, R M. Carotenoids bioavailability and bioconversion. *Annu Rev Nutr*, 2002, 22, 483-504.
- Yeum, K. J., dos Anjos Ferreira, A. L., Smith, D., Krinsky, N. I., & Russell, R. M. The effect of alpha-tocopherol on the oxidative cleavage of beta-carotene. *Free Radic Biol Med*, 2000, 29(2):105-14.
- Ylä-Ajos, M., Ruusunen, M., & Puolanne, E. Glycogen debranching enzyme and some other factors relating to post-mortem pH decrease in poultry muscles. *J Sci Food Agric*, 2007, 87:394-398.
- Yonekura, L., & Nagao, A. Intestinal absorption of dietary carotenoids. *Mol Nutr Food Res*, 2007, 51, 107-115.
- Young, M. E., Radda, G. K, & Leighton, B. Activation of glycogen phosphorylase and glycogenolysis in rat skeletal muscle by AICAR- an activator of AMP-activated protein kinase. *FEBS Lett*, 1996, 382: 43-47.
- Zaripheh, S., Nara, T. Y., Nakamura, M. T., & Erdman, J. W. Jr. Dietary lycopene downregulates carotenoid 15,15'-monooxygenase and PPAR- γ in selected rat tissues. *J Nutr*, 2006, 136, 932-938.
- Zayas, J. F., & Naewbanij, J. O. The effect of microwave heating on the textural properties of meat and collagen solubilization. *J Food Process Preserv*, 1986, 10, 203-214.
- Zhang, L., Yue, H. Y., Zhang, H. J., Xu, L., Wu, S. G., Yan, H. J., Gong, Y. S., & Qi, G. H. Transport stress in broilers: I. Blood metabolism, glycolytic potential, and meat quality. *Poult Sci*, 2009, 88, 2033-2041.

- Zhu, X., Ruusunen, M., Gusella, M., Zhou, G., & Puolanne, E.** High post-mortem temperature combined with rapid glycolysis induces phosphorylase denaturation and produces pale and exudative characteristics in broiler Pectoralis major muscles. *Meat Sci*, 2011, 89, 181-188.
- Zhuang, H., & Savage, E. M.** Comparisons of sensory descriptive flavour and texture profiles of cooked broiler breast fillets categorized by raw meat color lightness values. *Poult Sci*, 2010, 89, 1049-1055.

ANNEXE

Matériels & Méthodes

Sommaire (annexe)

1. Abattage, prélèvements, mesures physico-chimiques (plasma et viande)

1.1. Abattage des animaux

1.2. Prélèvements et mesures réalisés sur la chaîne d'abattage

1.3. Prélèvements et mesures réalisés 24h post-mortem

2. Biochimie des protéines

2.1. Extraction et dosage des protéines

2.2. Préparation des échantillons

2.3. Electrophorèse sur gel et transfert sur membrane

2.4. Immunomarquage et quantification des protéines

3. Biologie moléculaire

3.1. Extraction d'ADN génomique

3.2. Sexage moléculaire

3.3. Génotypage de la mutation A/G à la position 197 (*i.e.*, 621 bp en amont du codon ATG du gène BCMO1)

3.4. Préparation des ARN totaux

3.5. RT-qPCR

3.5.1. Reverse transcription (RT)

3.5.2. Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)

4. Dosages des pigments caroténoïdes et vitamines liposolubles

4.1. Extraction

4.1.1. Dans le plasma

4.1.2. Dans les tissus (Foie, Duodénum, Muscles)

4.2. Quantification par UPLC

4.2.1. Standards

4.2.2. Quantification

5. Indice de couleur du plasma

6. Références

1. Abattage, prélèvements, mesures physico-chimiques (plasma et viande)

1.1. Abattage des animaux

Au cours de la dernière pesée (9 semaines), les poulets destinés à l'abattage ont été mis en caisse puis transportés (5 min de transfert environ) à l'abattoir expérimental (agréé CEE) de l'UE PEAT de l'INRA de Tours. Les animaux ont été mis à jeun environ 7 h avant l'abattage. Les poulets ont été accrochés sur la chaîne pendant une durée d'une minute environ puis étourdis dans le bac d'électronarcose (80 mA ; 125 Hz ; 5 sec). Après échaudage, plumaison et effilage les carcasses ont été stockées en chambre froide (+2 °C).

1.2. Prélèvements et mesures réalisés sur la chaîne d'abattage

Selon les expériences différents prélèvements et mesures ont été réalisés :

- Des prélèvements sanguins ont été faits au moment de la saignée des animaux qui intervient de suite après l'électronarcose. Le sang a été récupéré au niveau du bec dans des tubes contenant soit de l'héparine (5 UI/mL de sang) ou de l'EDTA (1,6 mg/mL sang) selon les analyses, puis stockés dans de la glace pilée en vue de préparer des plasmas.
- Des prélèvements de tissus (muscle P. major du filet ou *Sartorius* de la cuisse, duodénum, foie, gras abdominal) ont aussi été effectués 15 minutes post-mortem, c'est-à-dire juste après l'effilage des poulets. Les différents prélèvements ont été immédiatement congelés dans de l'azote liquide et stockés à -80 °C en vue des mesures biochimiques ou moléculaires.
- Au même temps (15 min. post-mortem), le pH (pH15) du muscle P. major a été mesuré avec un pH-mètre portable muni d'une électrode en verre (Modèle 506, Crison Instruments, SA, Espagne) sur un broyat de muscle : 2 g dans 18 mL d'une solution de KCl (0,15 M) - iodoacétate de sodium (5 mM).

1.3. Prélèvements et mesures réalisés 24h post-mortem

Le lendemain de l'abattage, les carcasses ont été découpées de façon anatomique (Marché, 2000). Selon les expériences, le gras abdominal, le filet et la cuisse droite des carcasses ont été prélevés puis pesés afin de déterminer leurs rendements respectifs (en % du poids vif).

Sur les muscles P. major du filet prélevés, des mesures de pH (pH ultime) ont été réalisées par insertion directe de la sonde en verre du pH-mètre sur la face ventrale (interne) du muscle (Figure A1-A).

Les paramètres de couleur ont été mesurés à l'aide d'un spectrophotomètre portable (Hunterlab, Reston, VA 20190, USA) sur la face ventrale du muscle P. major au niveau de sa partie la plus épaisse (Figure A1-B). La mesure est faite dans le système standardisé CIELAB qui mesure simultanément l'indice de rouge a^* , l'indice de jaune b^* et la luminosité L^* liée au pouvoir de réflectance de la viande.

Pour la mesure de l'exsudat (représentatif de la capacité de rétention d'eau de la viande fraîche au cours du stockage), les filets ont été ensachés individuellement puis suspendus à l'aide d'un crochet (Figure A1-C). Au bout de 5 jours de ressuage à +2 °C, les filets ont été essuyés puis pesés afin d'estimer les pertes en eau par exsudation exprimées en pour cent du poids initial du muscle prélevé.



Figure A1 : Illustrations des prises de mesure de pH ultime (A), couleur (B) et exsudat (C) sur le muscle P. major du filet de poulet.

2. Biochimie des protéines

La quantification des niveaux protéiques a été réalisée par Western blot selon un protocole décrit dans la publication n°1.

2.1. Extraction et dosage des protéines

Environ 300 mg de muscle broyé ont été homogénéisés à l'ultra-Turrax T25 (Janke et Kunkelika-Labortechnik) dans 2 mL du tampon de lyse (NaCl 150 mM, Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Sodium fluoride 100 mM, Sodium pyrophosphate 4 mM,

Sodium orthovanadate 2 mM, Triton x100 1 %, Np-40 IGEPAL 0,5 %, eau distillée) supplémentée en anti-protéases (Protease inhibitor cocktail tablets, Roche). Les homogénats ont été solubilisés 30 min dans la glace puis centrifugés 30 min à 1000 g à +4 °C afin de précipiter les noyaux et les débris cellulaires. Le surnageant a été prélevé et soumis à une ultracentrifugation à +4 °C pendant 45 min à 162 000 g, aliquoté dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL et congelé à -80 °C.

Les protéines ont ensuite été dosées selon la méthode de Bradford (1976) avec le réactif Bio-Rad (Dye reagent concentrate, Bio-Rad). Sur une plaque de 96 puits, 10 µL d'échantillon dilué au 1/100 ont été mélangés à 30 µL d'eau distillée et 160 µL de réactif Bio-Rad dilué au 1/4 dans de l'eau distillée. La gamme d'étalonnage a été réalisée avec l'albumine sérique bovine (Bovin Serum Albumine ou BSA) concentrée à 0, 10, 20, 50, 100, 200 et 500 µg/mL. La lecture de l'absorbance a été effectuée à 595 nm par un lecteur de plaque TECAN Magellan V2.30 (Infinite M200).

2.2. Préparation des échantillons

La concentration des échantillons a été ajustée à 3µg/µL avec une solution de tampon de lyse complétée avec 25 µL du bleu de chargement (tampon Tris HCl 125 mM, bleu de bromophénol 0,08 %, β-mercaptoéthanol 5 %, sodium dodécyl sulfate 4 %, glycérol 50 %). Les échantillons ainsi préparés ont été chauffés à 95 °C pendant 5 min puis centrifugés à 12 000 g pendant 2 min.

2.3. Electrophorèse sur gel et transfert sur membrane

Les protéines de l'échantillon ont été séparées selon leur taille en conditions dénaturantes dans un gel de polyacrylamide à 10 % (ou 7,5 % pour l'analyse de la protéine mTOR) (SDS-PAGE). Le dépôt protéique était de 90 µg de protéines par puits. Une piste par gel était réservée au marqueur de taille. La composition des gels de concentration et de séparation est présentée dans le tableau A1. L'électrophorèse a été réalisée dans une cuve Bio-Rad pendant environ 2h/2h30. Un voltage de 50 V a été appliqué le temps de la migration dans le gel de concentration puis la séparation proprement dite a été réalisée à 70 V. Une fois la migration achevée, les protéines ont été transférées depuis le gel sur une membrane de nitrocellulose

(Amershan Hybond ECL, 0,45 μ m) en appliquant un voltage de 100 V pendant 1h dans la glace.

Tableau A1 : Composition des gels d'électrophorèse¹.

Gel de concentration (7,5%)		Gel de séparation (10%)	
H ₂ O sterile	1,81 ml	H ₂ O sterile	3,4 ml
-	-	Glycerol 50%	0,9 ml
Acrylamide (30%)	0,95 ml	Acrylamide (30%)	3 ml
Tris 1M (pH = 6,6)	1 ml	Tris 3M (pH = 8,8)	1,12 ml
SDS 10%	40 μ l	SDS 10%	90 μ l
Temed	2,5 μ l	Temed	5 μ l
Persulfate d'ammonium 10%	25 μ l	Persulfate d'ammonium 10%	250 μ l
Volume total	3,83 ml		8,76 ml

¹Quantités nécessaires pour la réalisation d'un gel

2.4. Immunomarquage et quantification des protéines

Une fois les protéines transférées, la membrane a été incubée dans du tampon Tris Buffer Saline (TBS, 20 mM Tris, 140 mM NaCl, pH = 7,6) contenant du lait écrémé en poudre dilué à 5% pendant 1h à température ambiante. Cette étape permet le blocage des sites d'interactions non spécifiques entre la membrane et les anticorps. La membrane a ensuite été lavée 3 fois 5 min avec du TBS Tween (0,1 % de Tween-20) avant d'être incubée toute la nuit avec l'anticorps primaire à 4 °C dilué dans de la BSA 5 % ou du lait écrémé en poudre 5 %. La membrane a de nouveau été lavée 3 fois 5 min avec du TBS Tween (0,1 % de Tween-20) avant d'être incubée 1h à température ambiante à l'abri de la lumière avec un anticorps secondaire couplé à un fluorophore (Alexa Fluor anti-souris ou anti-lapin selon l'origine de l'anticorps primaire utilisé) dilué dans un tampon de blocage Odyssey (réf 927-40000 LI-COR Biosciences). Après 3 lavages de 5 min dans du TBS Tween, les bandes ont été visualisées en fluorescence à infrarouge à l'aide de l'Odyssey Imaging System (LI-COR Inc. Biotechnology, Lincoln, NE, USA) et quantifiées par l'Odyssey Infrared Imaging System software (Application software, version 1.2).

3. Biologie moléculaire

3.1. Extraction d'ADN génomique

L'ADN a été extrait à partir de 2 plumes prélevées à l'aile sur chaque poussin à l'éclosion et stockées à +4 °C dans des microtubes eppendorf de 1,5 µL. A chaque échantillon de plumes sont ajoutés 800 µL de solution de lyse (EDTA 10 mM, Tris HCl 10 mM, NaCl 10 mM, SDS 0,5 %) et 10 µL de protéinase K à 20 mg/mL (Qiagen). Le tout est mélangé par inversion, puis mis à incuber à 56 °C pendant 3h minimum (ou à 37 °C pendant une nuit) en bain-marie en agitant toutes les heures si possible. Le mélange est ensuite centrifugé rapidement afin d'éliminer la condensation. Quatre cent microlitres de NaCl 6 M saturé stocké à 4 °C sont ajoutés avant agitation vigoureuse (2 × 30 s au vortex et 2 × 30 s par agitation manuelle) jusqu'à obtention d'un mélange homogène. Le mélange est ensuite centrifugé 30 min à 17 000 g à 4 °C. Environ 1000 µL du surnageant sont prélevés puis ajoutés rapidement dans 3 mL d'éthanol absolu. Une méduse d'ADN se forme. Elle est récupérée puis égouttée sur la paroi du tube pour enlever l'excédent d'éthanol. La méduse est finalement déposée dans le fond d'un tube de 1,5 mL, mise à sécher environ 5 min à 37 °C (attention, les méduses ne doivent pas trop sécher car la solubilisation risque d'être moins facile ensuite) puis dissoute dans 250 µL de Tris-EDTA 10 µM/0,1 µM.

3.2. Sexage moléculaire

La détermination du sexe des animaux a été réalisée par PCR en point final à partir des ADN extraits des plumes de poussins selon la méthode de Clinton et al. (2001). Cette méthode a été mise au point pour déterminer le sexe des jeunes embryons mais peut aussi être utilisées à des stades ultérieurs. Cette méthode évite les erreurs de sexage fréquentes au moment de l'éclosion. Le protocole est basé sur une réaction de PCR qui combine les amplifications simultanées d'une séquence spécifique (*XhoI* repeat) du chromosome W (WC) des femelles et celle d'un gène contrôle (ARN ribosomal 18S) dans un tube à essai unique. Les deux couples d'amorces utilisés pour la réaction sont :

- Sens WC : 5'- CCAAATATAACACGCTTCACT -3',
- Antisens WC : 5'- AAATGAATTATTTTCTGGCGA -3'.
- Sens 18S : 5'- AGCTCTTTCTCGATTCCGTG -3',

- Antisens 18S : 5'- GGGTAGACACAAGCTGAGCC -3',

La réaction se fait dans le mélange réactionnel (volume final 25 µL) décrit dans le Tableau A2.

Tableau A2 : Composition du mélange réactionnel utilisé pour la réalisation de la PCR de sexage moléculaire

	Volume	Concentration
Tampon Taq Polymérase 10X	2,5 µl	1X
MgCl ₂	0,75 µl	50 mM
dNTP (mélange de A, T, G, C)	0,5 µl	10 mM*
Amorces WC sens	2,5 µl	10 µM
Amorces WC anti-sens	2,5 µl	10 µM
Amorces 18S sens	1,25 µl	10 µM
Amorces 18S anti-sens	1,25 µl	10 µM
Taq polymérase Interchim UPS53923 (5U/µL)	0,7 µl	3,5 U
Echantillon d'ADN (5 ng/µl)	1 µl	0,2 ng/µl
H2O (qsp 25 µl)	12 µl	-

*Concentration pour chaque dNTP

Les conditions d'amplification sont les suivantes : 94 °C pendant 2 min, suivi de 35 cycles comprenant 5 s à 94 °C, 5 s à 56 °C, 5 s à 72 °C et d'une étape finale à 72 °C pendant 5 min. Les fragments amplifiés par PCR sont ensuite visualisés sur un gel d'agarose à 2% sur lequel sont déposés 10 µL de produit de PCR + 2 µL de tampon de charge (Blue/Orange Loading Dye 6X, Promega). L'interprétation est la suivante : s'il n'y a qu'une bande qui apparaît à 256 bp (taille de l'amplicon 18S), cela signifie que l'échantillon est issu d'un mâle. Si deux bandes apparaissent à 256 et 415 bp (tailles respectives du 18S et de la séquence WC), l'échantillon d'ADN appartient à une femelle (Figure A2).

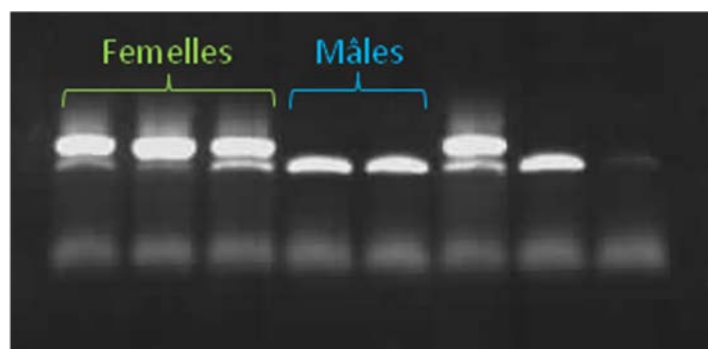


Figure A2 : Exemple de profil d'électrophorèse des fragments amplifiés par PCR lors du sexage moléculaire

3.3. Génotypage de la mutation A/G à la position 197 (*i.e.*, 621 bp en amont du codon ATG du gène BCMO1)

Le génotypage a été fait par la mise en œuvre de la technique de HRM (High-Resolution Melting) à partir des ADN extraits des plumes de poussins (ou de sang dans le cas des reproducteurs). Un couple d'amorces a été choisi de manière à amplifier le fragment contenant la mutation à tester :

Sens : 5'- AGGCTTCGAGTTGCTGATAACC -3',

Anti-sens : 5'- AGCAGCACACCTTTGAATTAAACA -3'.

Un troisième oligonucléotide est utilisé en tant que sonde allèle-spécifique :

5'-CTATTCTACATTCTCCCACGTGTGATCTGATT-P-3'.

Les amplifications PCR ont été réalisées dans un mélange réactionnel (20 μ L final) contenant 30 ng d'ADN génomique, 0,5 μ M de l'amorce sens, 0,1 μ M de l'amorce anti-sens et 0,4 μ M de la sonde, 1 unité de Taq polymérase (UPS53923, Interchim) et 1X de tampon associé, 2 mM de $MgCl_2$, 1 μ L d'agent de marquage (LC Green Plus Dye, BioFire Diagnostics, Salt Lake City, USA) et 0,2 mM de chaque dNTP (DNTP100, Sigma Aldrich), en utilisant le thermocycleur LightCycler® 480 II (Roche).

Tableau A2 : Composition du mélange réactionnel utilisé pour la réalisation de la PCR de génotypage

	Volume	Concentration
Tampon Taq Polymérase 10X	2 µl	1X
MgCl ₂	1 µl	83 mM
dNTP (mélange de A, T, G, C)	0,4 µl	10 mM*
Amorces sens à 5 µM	2 µl	0,5 µM
Amorces anti-sens à 5 µM	0,4 µl	0,1 µM
Sonde à 5 µM	1,6 µl	0,4 µM
Taq polymérase Interchim UPS53923 (5U/µL)	0,2 µl	1 U
LC Green Plus Dye	1 µl	-
Echantillon d'ADN (5 ng/µl)	8 µl	2 ng/µl
H2O (qsp 20 µl)	3,4 µl	-

*Concentration pour chaque dNTP

La première dénaturation de 10 min à 95 °C est suivie de 50 cycles comprenant 1 s de dénaturation à 95 °C, 1 s d'hybridation à 58 °C, et 10 s d'élongation à 72 °C. La courbe de fusion est obtenue par une augmentation de la température à 95 °C pendant 1 s, puis par diminution de la température à 40 °C et chauffage (0,02 °C/s) jusqu'à 95 °C sur le même appareil (LightCycler® 480 II, Roche).

Les résultats sont lisibles de la manière indiquée sur la Figure A3.

- individu homozygote A/A (mésappariement avec la sonde) : pic de fluorescence à 63 °C
- individu homozygote G/G (appariement parfait avec la sonde) : pic de fluorescence à 68 °C
- individu hétérozygote A/G : pics de fluorescence à 63 °C et 68 °C.

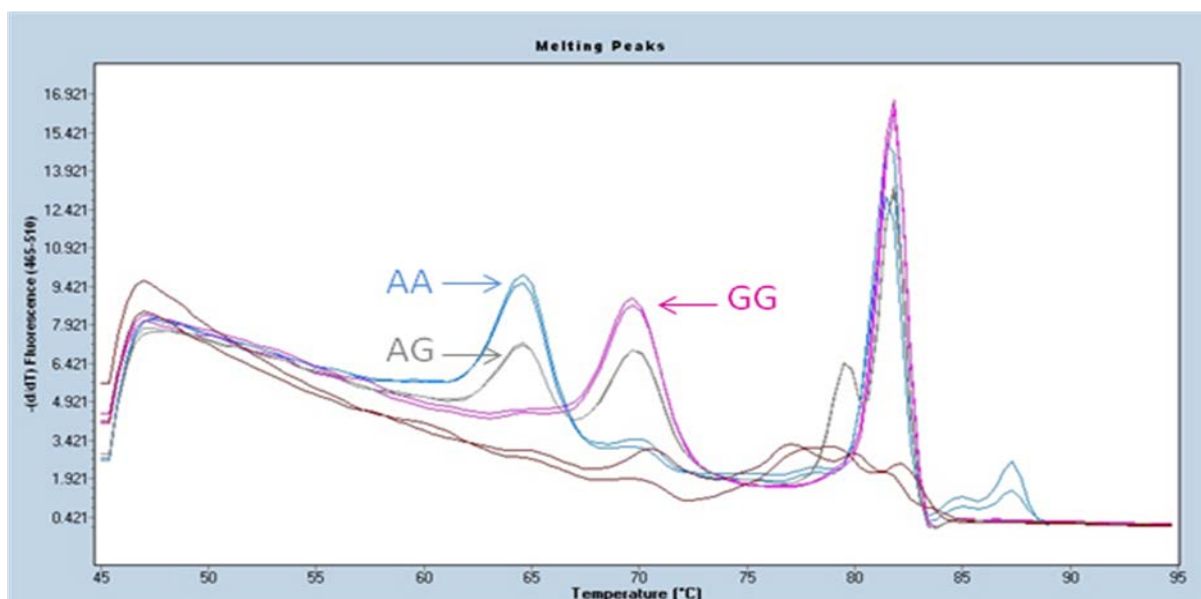


Figure A3 : Profil HRM permettant le génotypage des animaux à la mutation se situant 621 bp en amont du codon ATG du gène BCMO1.

3.4. Préparation des ARN totaux

Pour faciliter l'étape de solubilisation, les différents tissus que nous avons étudiés (muscles *P. major* et *Sartorius* et foie) ont préalablement été broyés manuellement dans l'azote liquide. Concernant le duodénum, les ARN ont été préparés à partir de la muqueuse interne prélevée par racle 15 min après l'abattage. L'extraction des ARN totaux a été réalisée à l'aide de la solution RNA Now (Ozyme, France) selon le principe de Chomzynski and Sacchi (1987). Cent milligrammes de tissu ont été homogénéisés en présence de RNA Now (1 mL) à l'aide d'un broyeur à billes (Rescht MM 301). Après addition de 200 μ L de chloroforme pur, les homogénats ont été agités manuellement pendant 1 min puis placés 5 min dans la glace. Après centrifugation (10 min, 12 000g), la phase supérieure contenant les ARN a été prélevée et mélangée à un volume égal d'isopropanol. Après 5 min de précipitation dans la glace, les ARN ont été centrifugés (10 min, 12 000g) et les culots d'ARN obtenus ont été lavés successivement deux fois à l'éthanol 70 % (1 mL) puis centrifugés à 5 000 g (5 min). Enfin, ils ont été séchés à l'air libre pendant 10 min et les ARN ont été remis en suspension dans 30 μ L d'eau stérile. Les échantillons d'ARN ont été dosés par spectrophotométrie à 260 nm et leur contamination éventuelle par des protéines estimée à 280 nm (spectrophotomètre NanoDrop, ND-1000). Les ARN extraits (1 μ g/ μ L) ont été stockés à -80 °C.

Afin d'éliminer toute trace d'ADN génomique, les ARN ont été traités à la DNase (kit DNA-free, Ambion). Dix microlitres d'ARN (1 µg/µL) ont été incubés à 37 °C pendant 20 min en présence de 1 µL de Tampon DNase et 1 µL de l'enzyme DNase. Puis 1 µL d'inhibiteur de l'activité DNase a été ajouté afin d'arrêter la réaction. Après 2 min à température ambiante, les échantillons ont été centrifugés (1 min, 10 000g) afin de précipiter l'inhibiteur de l'enzyme. Le surnageant a été prélevé et stocké à -80 °C.

3.5. RT-qPCR

La RT-qPCR se déroule en deux phases. Une première phase de transcription inverse correspond à la transcription des ARN messager (ARNm) en ADN complémentaire (ADNc) et une seconde phase correspond à une réaction polymérisation en chaîne en temps réel (ou qPCR) de l'ADNc synthétisé à partir des ARN tissulaires extraits.

3.5.1. Reverse transcription (RT)

Les ADN complémentaires (ADNc) ont été obtenus par transcription inverse à partir de 5 µL d'ARN traités à la DNase mélangés à 5 µL d'eau ultra pure, 1 µL d'hexamères nucléotidiques (Random primers 0,5 µg/µL, Promega) et 1 µL de désoxynucléotides (dNTP mix 10 mM, Sigma). Une solution contenant 2 µL de DTT (0,1 M), 1 µL de RNase out (inhibiteur de RNase), 1 µL d'enzyme SuperScript II (SuperScript™ Reverse transcriptase II, Invitrogen 40 units/µL) et 4 µL de tampon (5X) de la reverse transcriptase (nécessaire pour établir les conditions optimales à la réaction) a été ajoutée à chaque échantillon et la réaction de transcription inverse a été effectuée pendant 50 min à 42 °C. Dix microlitres d'H₂O ultrapure ont ensuite été ajoutés. Les ADNc ainsi obtenus ont été stockés à -20 °C.

3.5.2. Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Des mélanges SYBR green sont utilisés pour visualiser l'amplification de l'ADNc des gènes codant pour les différentes enzymes étudiées y compris les gènes de référence : 18S ribosomal dans la publication n°2 ou 18S ribosomal, β-actine et GAPDH pour la publication n°3. Ces mélanges (ou Mix) sont constitués de dNTPs, d'une ADN polymérase Hot Start activée à 95 °C, d'une Uracile-N Glycosylase, de 5 mM de MgCl₂, d'un stabilisateur, d'une référence passive, le ROX, et du SYBR green. Les produits (ADNc) issus de la transcription inverse ont été dilués au 1/50^{ème} pour la plupart des gènes étudiés et au 1/5000^{ème} pour l'ARNr18S. Les

échantillons ont été déposés en triple sur des plaques de 96 puits (Publication n°2) ou de 384 puits (Publication n°3). Chaque plaque contenait un contrôle négatif (H₂O) déposé en double ainsi qu'une référence (mélange réalisé à partir de 2 µg d'ARN de chaque échantillon). La réaction de qPCR a été réalisée à partir de 5 µL d'ADNc en présence de 5,5 µL d'eau ultra pure, 12,5 µL de mix SYBR green I qPCR Master Mix Plus (Eurogentec, Angers, France), 1 µL d'amorce sens, 1 µL d'amorce anti-sens (Publication n°2) ou à partir de 2,5 µL d'ADNc en présence de 5 µL de mix LightCycler® SYBR Green I Master I (Roche Applied Science, Mannheim, Allemagne), 1,5 µL d'eau, 0,5 µL d'amorce sens et 0,5 µL d'amorce anti-sens (Publication n°3). Les séquences de chaque paire d'amorces utilisées pour amplifier les différents gènes analysés sont décrites dans les publications n°2 et 3.

Pour la publication n°2, la réaction de qPCR a été réalisée dans un thermocycleur (ABI Prism 7000, Applied Biosystems), dans les conditions suivantes : une étape de dénaturation initiale (95 °C pendant 10 min), puis 40 cycles d'amplification comprenant une étape de dénaturation (95 °C, 15 s) suivi par une phase d'hybridation et d'élongation (1 min à 60, 62 °C selon les gènes). Afin de prouver la spécificité et l'unicité du fragment d'ADNc amplifié, une étape supplémentaire de dissociation a été réalisée à la fin des 40 cycles (95 °C, 15 s ; 60 ou 62 °C selon les gènes durant 20 s puis 15 s à 95 °C). Pour la publication n°3, la réaction de qPCR a été réalisée dans un LightCycler® 480 II (Roche) dans les conditions suivantes : une étape de dénaturation initiale (95 °C pendant 5 min), puis 45 cycles d'amplification comprenant une étape de dénaturation (95 °C, 10 s) suivi par une phase d'hybridation et d'élongation (20 s à 60 ou 62 °C selon les gènes puis 10 s à 72 °C).

Les efficacités (E) des réactions de PCR ont été déterminées en réalisant des courbes de dilution standard. Pour l'ensemble des gènes, l'efficacité était proche de 100 %. La quantification des ARN se fait grâce à une analyse automatique réalisée par le logiciel 7000 System Software (ABI Prism 7000) ou celui du Lightcycler® 480. Chaque réaction est caractérisée par un Ct (Cycle threshold) correspondant au nombre de cycles nécessaires pour que la fluorescence émise franchisse un seuil de détection prédéfini. Le Ct est inversement proportionnel au nombre de copies du fragment amplifié. Pour chaque échantillon un Ct moyen a été calculé à partir des 3 répliques mesurés. Les niveaux d'expression des gènes d'intérêt ont ensuite été calculés selon la formule suivante :

$$\text{Quantité d'ARNm gène d'intérêt} = 2^{\Delta\text{Ct (référence - échantillon)}}$$

Les niveaux d'expression des gènes d'intérêt ont été rapportés aux niveaux d'expression des gènes de références : 18S pour la publication n°2 :

$$\text{Quantité d'ARNm gène d'intérêt/18S} = 2^{\Delta C_{\text{t}}^{\text{gène}} (\text{référence} - \text{échantillon})} / 2^{\Delta C_{\text{t}}^{18\text{S}} (\text{référence} - \text{échantillon})}$$

Dans le cas de la publication n°3, les niveaux d'expressions des gènes d'intérêt ont été normalisés par rapport à 3 gènes de références (18S, β -actine et GAPDH) en utilisant la procédure du logiciel geNorm (Hellemans et al., 2007).

4. Dosages des pigments caroténoïdes et vitamines liposolubles

Les caroténoïdes et les vitamines A et E ont été dosés, après extraction par solvant, par UPLC (Chromatographie Liquide Ultra Performance). Dans chacune des matrices, l'extraction de ces composés se fait simultanément suivant un mode opératoire spécifique. Ces composés étant photosensible l'extraction est réalisée dans une pièce à éclairage jaune, à température ambiante. Un standard interne (SI) est rajouté dans chaque échantillon afin de calculer le rendement d'extraction. Le SI est une molécule qui n'est pas naturellement présente dans l'échantillon et qui est rajoutée en début d'extraction en concentration connue. Il doit être distinguable des composés dosés sur le chromatogramme, tout en ayant des propriétés physico-chimiques proches de ces derniers. L'équinénone, l'acétate de rétinol et l'acétate de tocophérol ont été choisis comme SI pour le dosage respectif des caroténoïdes, de la vitamine A et de la vitamine E.

4.1. Extraction

4.1.1. Dans le plasma

L'extraction dans le plasma a été réalisée suivant la méthode décrite par Lyan et al. (2001). Le plasma est dans un premier temps « déprotéinisé » par un traitement à l'éthanol puis les composés liposolubles sont extraits avec de l'hexane. Un volume d'éthanol contenant le SI est ajouté à un volume de plasma pour la phase de « déprotéinisation ». Les composés liposolubles sont ensuite extraits deux fois consécutives par l'ajout de deux volumes d'hexane. Après agitation 30 secondes au vortex puis centrifugation (5 min, 1000g à 4 °C), les deux phases hexaniques sont récupérées, poolées puis évaporées sous azote. L'extrait sec est ensuite repris avec 20 μ L de tétrahydrofurane (THF) et 180 μ L d'un mélange

acétonitrile/dichlorométhane/méthanol (75/10/15) puis filtré à 0,22 µm ; 10 µL de cet extrait sont injectés sur l'UPLC.

4.1.2. Dans les tissus (Foie, Duodénum, Muscles)

Les tissus prélevés (duodénum, foie, muscles *Sartorius* et *Pectoralis major*) sont conservés à -80 °C à l'abri de la lumière, puis ils sont broyés à l'azote liquide juste avant l'extraction. De la même manière que pour le plasma, dans un premier temps les échantillons sont « déprotéinisés » à l'éthanol puis les composés liposolubles extraits avec de l'hexane. Le tissu broyé (200 mg pour le foie et le duodénum, 1 g pour les muscles) est homogénéisé et « déprotéinisé » avec 1 ml d'éthanol contenant le SI, puis deux extractions consécutives avec 4 mL d'hexane sont réalisées. Après agitation 30 secondes puis centrifugation (5 min, 1000g à 4 °C), les deux phases hexaniques sont récupérées, poolées et évaporées sous azote. L'extrait sec est ensuite repris avec 20 µL de tétrahydrofurane (THF) et 180 µL d'un mélange acétonitrile/dichlorométhane/méthanol (75/10/15) puis filtré à 0,22 µm avant injection sur l'UPLC (5 µL pour le foie et 20 µL pour le duodénum et les muscles).

4.2. Quantification par UPLC

4.2.1. Standards

Pour chaque composé une courbe de calibration externe comprenant 5 points de concentrations différentes est réalisée à partir d'un mélange de standards. Les standards purs sont tout d'abord dissous dans du tétrahydrofurane (THF) puis dilués avec de l'acétone. Afin de connaître leur concentration exacte, chaque solution de standard est dosée juste avant son utilisation par spectrophotométrie à 450 nm, 325 nm et 292 nm respectivement pour les caroténoïdes, la vitamine A et la vitamine E.

Pour chaque composé, connaissant leurs coefficients d'extinction molaires (ϵ), on utilise la loi de Beer-Lambert : $DO = \epsilon \times l \times c$

avec DO = densité optique à une longueur d'onde donnée,

l = longueur du trajet optique (donc de la cuve) en cm,

c = concentration de la solution en mol.L⁻¹,

ϵ = coefficient d'extinction molaire de l'espèce absorbante exprimé en mol⁻¹.L.cm⁻¹.

Les standards sont d'abord injectés sur l'UPLC individuellement afin de connaître leur temps de rétention et leur spectre d'absorption, puis un mélange est réalisé afin d'obtenir les courbes de calibration. Les quantités injectées sont comprises entre 1 et 50 ng pour les caroténoïdes, 35 et 175 ng pour la vitamine A et 500 et 2500 ng pour la vitamine E.

Les concentrations en caroténoïdes et en vitamines A et E des échantillons sont calculées à partir des courbes standards établies selon la formule $y = ax + b$,

avec y = aire sous la courbe

a = pente courbe de calibration

x = quantité injectée

b = ordonnée à l'origine

Les concentrations sont ajustées par le rendement d'extraction calculé à l'aide du SI ajouté dans chaque échantillon. Une illustration du mode de calcul est présentée dans la figure A4 ci-dessous.

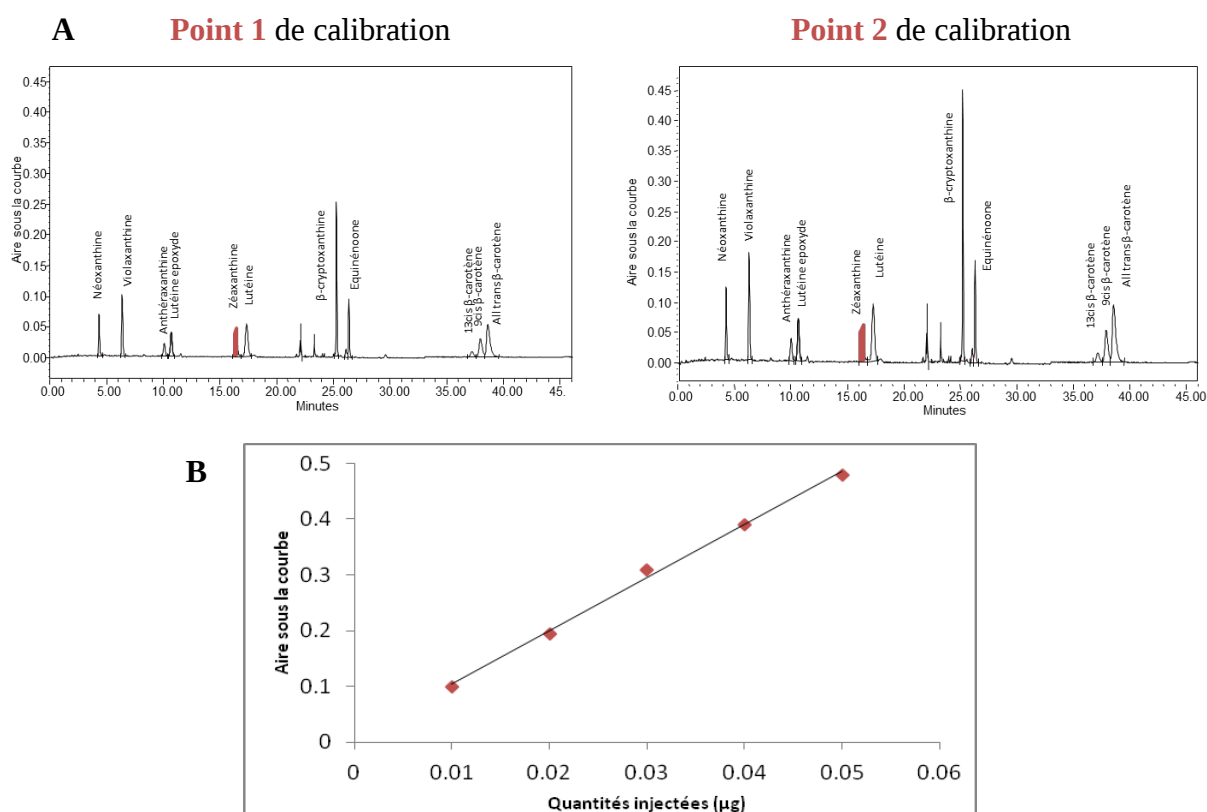


Figure A3 : Chromatogrammes de standards de caroténoïdes de concentrations connues injectés en différentes quantités (**A**). Courbe de calibration de la zéaxanthine (**B**)

4.2.2. Quantification

Le dosage simultané des caroténoïdes, vitamines A et vitamines E par UPLC a été réalisé avec la méthode décrite par Chauveau-Duriot et al. (2010). L'UPLC utilisé est un système Waters Acquity® (Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France), équipé d'un détecteur à barrettes de diodes permettant de faire un scan de 210 à 600 nm. Le logiciel Empower Pro® (Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) utilisé permet le contrôle de l'appareillage, l'acquisition et le traitement des résultats. Une colonne 150 × 2,1 mm Acquity UPLC HSS T3, 1.8-µm (Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines; France) est utilisée avec un gradient linéaire d'acétonitrile-dichlorométhane-méthanol (A) 75-10-15 et d'eau-acétate ammonium 0,05 M (B). Le gradient est le suivant : aux conditions initiales 75:25 (A:B), de 0 à 20 min 75:25 (A:B), de 20 à 21 min 100:0 (A:B), de 21 à 30 min 98:2 (A:B), de 30 à 44 min 98:2 (A:B) et finalement un retour aux conditions initiales. Le débit est de 0,4 mL/min et la température de la colonne est maintenue à 35 °C avec un four à colonnes. Les caroténoïdes, vitamines A, et vitamines E sont détectés respectivement à 450, 325, et 292 nm, et identifiés par comparaison avec le temps de rétention et le spectre d'absorption des standards purs injectés individuellement.

5. Indice de couleur du plasma

L'indice de couleur (IC) du plasma est une méthode rapide non destructive qui permet d'estimer la teneur en caroténoïdes du plasma, la teneur en β -carotène expliquant environ 50 % des variations de l'indice de couleur du plasma (Calderón et al., 2007).

L'IC du plasma correspond à l'intégration du spectre d'absorption mesuré entre 450 et 530 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Tecan en utilisant des microplaques de 96 puits. L'IC du plasma correspond à la somme des aires de trapèzes (AT) entre 450 nm et 530 nm selon la formule suivante :

$$IC_{450-530\text{ nm}} = AT_{450-460} + AT_{460-470} + AT_{470-480} + AT_{480-490} + AT_{490-500} + AT_{500-510} + AT_{510-520} + AT_{520-530}.$$

La mesure est répétée 3 fois pour chaque échantillon et l'IC correspondant à la moyenne des 3 répliques.

6. Références

- Calderón, F., Chauveau-Duriot, B., Martin, B., Graulet, B., Doreau, M. & Nozière, P.** 2007. Variations in carotenoids, vitamins A and E, and color in cow's plasma and milk during late pregnancy and the first three months of lactation. *J Dairy Sci*, 90, 2335-2346.
- Chauveau-Duriot, B., Doreau, M., Nozière, P. & Graulet, B.** 2010. Simultaneous quantification of carotenoids, retinol, and tocopherols in forages, bovine plasma, and milk: validation of a novel UPLC method. *Anal Bioanal Chem*, 397, 777-790.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- Clinton, M., Haines, L., Belloir, B., & McBride, D.** 2001. Sexing chick embryos: A rapid and simple protocol. *Br Poult Sci*, 42, 134-138.
- Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, & Vandesompele J.** 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol*, 8:R19
- Lyan, B., Azaïs-Braesco, V., Cardinault, N., Tyssandier, V., Borel, P., Alexandre-Gouabau, M.C. & Grolier, P.** 2001. Simple method for clinical determination of 13 carotenoids in human plasma using an isocratic high-performance liquid chromatographic method. *J Chromatogr B*, 751, 297-303.
- Marché, G.** 1995. La découpe anatomique et la dissection des volailles, INRA-SYSAAF Eds, pp.71

Résumé

Plusieurs acteurs moléculaires impliqués dans les variations de qualité de la viande ont été récemment mis en évidence chez le poulet. Ma thèse a pour objectif d'approfondir l'étude de leur régulation en étudiant l'impact de facteurs alimentaires en interaction avec l'origine génétique des animaux. Il s'est articulé autour de deux thématiques qui impliquent des acteurs moléculaires et des critères de qualité de viande indépendants : le rôle de l'AMPK (AMP-activated protein kinase) dans le contrôle du turnover du glycogène musculaire et des caractères qui en dépendent (pH, rétention d'eau, couleur) et l'implication de BCMO1 (β , β -carotene-15,15'-monooxygenase) dans les variations de teneurs en pigments caroténoïdes et de coloration. Nos résultats soulignent dans les deux cas la possibilité de moduler les caractères de qualité *via* l'alimentation avec des réponses qui dépendent des caractéristiques génétiques des animaux. Nos travaux ont aussi permis d'améliorer la compréhension de la régulation des biomarqueurs étudiés par les nutriments et la génétique et contribueront à terme à la mise en place de nouvelles stratégies de production permettant d'optimiser la qualité du poulet de chair en réponse aux attentes de la filière et des consommateurs.

Mots clefs : Qualité des viande, glycogène, caroténoïdes, AMP-activated protein kinase, β , β -carotene-15,15'-monooxygenase, nutrition, génétique, poulet.

Résumé en anglais

Several molecular mechanisms involved in the variations of poultry meat quality were recently identified in chickens. My thesis aims to further study their regulation by exploring the impact of dietary factors in interaction with the genetic origin of animals. It was structured around two themes that involve independent molecular mechanisms and meat quality criteria: the role of AMPK (AMP-activated protein kinase) in the control of muscle glycogen turnover and related meat traits (pH, water retention, color), and the involvement of BCMO1 (β , β -carotene-15, 15'-monooxygenase) in controlling levels of carotenoid pigments and yellow color. Our results emphasize in both cases the possibility of modulating quality traits through nutrition, with effects that depend on the genetic characteristics of animals. Our work has also improved the understanding of the regulation of studied biomarkers by genetics and nutrients. This should contribute to the development of new production strategies to optimize the quality of broilers in response to expectations of poultry producers and consumers.

Key words: Meat quality, glycogen, carotenoids, AMP-activated protein kinase, β , β -carotene-15,15'-monooxygenase, nutrition, genetics, chicken.